

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**Katerina Špilka**

***miR-34a* regulatoorsed sihtmärgid eesnäärmevähi rakkudes**

Magistritöö

Juhendaja Tarmo Annilo, PhD

Tartu 2014

## Sisukord

Lühendid	3
Sissejuhatus	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. miRNAde avastamine ja levik	6
1.2. miRNAde biogenees	6
1.3. miRNAde toimemehhanism	8
1.4. miRNAd ja vähk	9
1.5. miR-34 perekond	10
1.5.1. <i>miR-34a</i> vähi biogeneesis	10
1.5.2. <i>miR-34a</i> ja rakutsükl	12
1.5.3. <i>miR-34a</i> ja apoptoos	12
1.6. <i>miR-34a</i> vähiteraapias	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
2.1. Eesmärgid	17
2.2. Materjal ja meetodika	17
2.2.1. Kasutatud rakuliinid ja söötmed	17
2.2.2. Rakukultuuri transfektsioon	17
2.2.3. RNA eraldamine	18
2.2.4. RNA kontsentratsiooni mõõtmine	18
2.2.5. Kvantitatiivse reaalaaja PCRiga seotud katsed	19
2.2.5.1. <i>miR-34a</i> transfektsiooni kontroll	19
a. cDNA süntees TaqMan süsteemi kasutamisel	19
b. Kvantitatiivne reaalaaja PCR	20
2.2.5.2. <i>miR-34a</i> sihtmärkgeenide ekspressiooni uurimine	21
a. <i>miR-34a</i> sihtmärkgeenide valimine ja praimerite disain	21
b. Primerite kontroll	22
c. Kvantitatiivne reaalaaja PCR	24
2.2.6. Reaalaaja qPCRi andmete statistiline analüüs	26
3. TULEMUSED JA ARUTELU	27
3.1. <i>miR-34a</i> miimiku transfektsiooni kontroll	27
3.2. Sihtmärkgeenide valimine ja praimerite disain	28
3.3. Sihtmärkgeenide ekspressiooni analüüs	29
3.4. <i>miR-34a</i> sihtmärkgeenide ekspressioon erinevates ajapunktides	31
3.4.1. Ajapunktide valimine	31
3.4.2. <i>miR-34a</i> sihtmärkide ekspressioon erinevates ajapunktides	32
3.5. Endogeensete referentskontrollide valiku mõju katsetulemusele	34
3.6. Järeldused	36
3.7. Kokkuvõtte	37
4. Summary	38
Tänuavaldused	39
Kasutatud kirjandus	40
Kasutatud veebiaadressid	49
Lisad	50
Lihtlitsents	53

## Lühendid

18S- 18S ribosomaalne RNA (*18S ribosomal RNA*)

ACTB-  $\beta$ -aktiin (*Beta-actin*)

AGO – Argonaut (*Argonaute*)

Bax- *bcl-2-like protein 4*

Bcl-2- B-rakuline lümfoom 2 (*B-cell lymphoma 2*)

BIRC5- *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*

CDK – tsükliin-sõltuv kinaas (*cyclin-dependent kinase* )

cDNA- komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

CLL – krooniline lümfotsüütiline leukeemia (*chronic lymphocytic leukaemia*)

Ct– lävitsükk (*cycle threshold*)

DGCR8 – kaheahelalise RNAga seonduv valk (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*)

TAR – transaktivatsioonitundlik (*transactivation responsive*)

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dsRBP- kaheahelalise RNAga seonduv valk (*double-stranded RNA-binding protein*)

E2F3 – E2F perekonna transkriptsioonifaktor 3

Foxo- *Forkhead box subfamily O*

GAPDH- *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

NLE- neutraalne lipiidne emulsioon (*neutral lipid emulsion*)

Noxa- *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*

PBS– *phosphate-buffered saline*

PC-3- inimese eesnäärmevähi rakuliin (*human prostate cancer cell line*)

Pre-miRNA – prekursor-miRNA

pri-miRNA – mikroRNA primaarne eellasmolekul

Puma- *p53 upregulated modulator of apoptosis*

RISC-RNA indutseeritud vaigistuskompleks (*RNA-induced silencing complex*)

SIRT1- *silent information regulator 1*

TGI- tuumori kasvu inhibeerimise efektiivsus (*tumor growth inhibition*)

TP53- tuumorvalk 53 (*tumor protein 53*)

TRBP – transaktivatsioonitundlik RNA-seonduv valk

UTR- mittetransleeritav ala (*untranslated region*)

YY1- *yin yang 1*

## Sissejuhatus

Vähk on maailmas üks levinumaid surmapõhjustajaid. 2008 aastal suri vähi tõttu 7,6 mln inimest, mis moodustab 13% kõikidest surmadest<sup>1</sup>. Vähk on multifaktoriaalne haigus, mille arengus on olulised nii geenid kui ka keskkonnamõju. Eesnäärmevähk on üks sagedasemaid vähkkasvajaid meestel kopsuvähi järel. Risk haigestuda kasvab vanusega ning kokku haigestub elu jooksul üle 15% meestest.

Paljud uuringud on näidanud, et mittekodeerivad RNAd on olulised geenide avaldumise ja rakuliste protsesside regulaatorid. Üheks enimuuritud mittekodeerivate RNAd klassiks on mikroRNAd (miRNAd), ~22 nukleotiidi pikkused reguloormolekulid, mis seonduvad mRNA komplementaarse järjestusega. Nad osalevad olulistes bioloogilistes protsessides ning mõjutavad ka vähiteket.

Viimastel aastatel on uuritud miRNAd ekspressiooni muutusi erinevates vähitüüpides (Garzon R jt., 2009). Paljudes vähitüüpides on miRNAd ekspressioon ning normaalne funktsioon häirunud. Kuna mitmed miRNAd kontrollivad onkogeenseid signaaliradasid, on uuritud võimalusi kasutada neid terapeutiliste agentidena (Wiggins JF jt., 2010). Näiteks võib tuua tuumorsupressor miRNA *miR-34a*, mille ekspressioon on alla reguleeritud paljudes kasvajaes, sealhulgas ka eesnäärmevähis.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on uurida sünteetilise *miR-34a* miimiku toimet sihtmärkgeenide ekspressioonile PC-3 rakuliinis ning hinnata sellise katsesüsteemi kasutatavust *miR-34a* asendusravi väljatöötamisel.

---

<sup>1</sup> <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/>

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 *miRNAd avastamine ja levik.*

MikroRNA-d (miRNA-d) on väikesed (22-25 nt), evolutsiooniliselt konserveerunud mittekodeerivad RNA molekulid, mis toimivad geenide ekspressiooni post-transkriptsiooniliste regulaatoritena erinevates organismides (Lin H. ja Gregory J, 2004). miRNA-d moduleerivad sihtmärkgeenide ekspressiooni mRNA degradatsiooni või translatsiooni inhibeerimise kaudu.

miRNA-d reguleerivad erinevaid bioloogilisi protsesse, kaasa arvatud rakkude proliferatsiooni ja differentseerumist ning organismi arengut. Samuti on nad seotud rakutsükli regulatsiooniga ning vähitekke protsessiga. Vähitekkes võivad nad toimida nii tuumorsuppressorite kui ka onkogeenidena (Javed A jt., 2013).

miRNA-d avastati 1993. aastal nematoodis *Caenorhabditis elegans*, kui kirjeldati väike mittekodeeriv RNA molekul *lin-4*, mis reguleerib *lin-14* ekspressiooni (Lee R jt., 1993). Paar aastat hiljem avastati järgmine miRNA (*let-7*), samuti nematoodist *C. elegans* (Reinhart BJ jt., 2000). Pärast *lin-4* ja *let-7* avastamist eristati miRNA-d eraldi väikeste mittekodeeritavate RNA-de rühmana (Kim VN jt., 2009). Praeguseks on kirjeldatud erinevatest organismidest 24 521 juuksenõela struktuuri omavat prekursor-miRNA-d ning 30 424 küpse miRNA järjestust 206 erinevas liigis (*miRBase*, v20, Juuni 2013) (Kozomara A. Ja Griffiths-Jones S, 2013).

## 1.2 *miRNAd biogenees.*

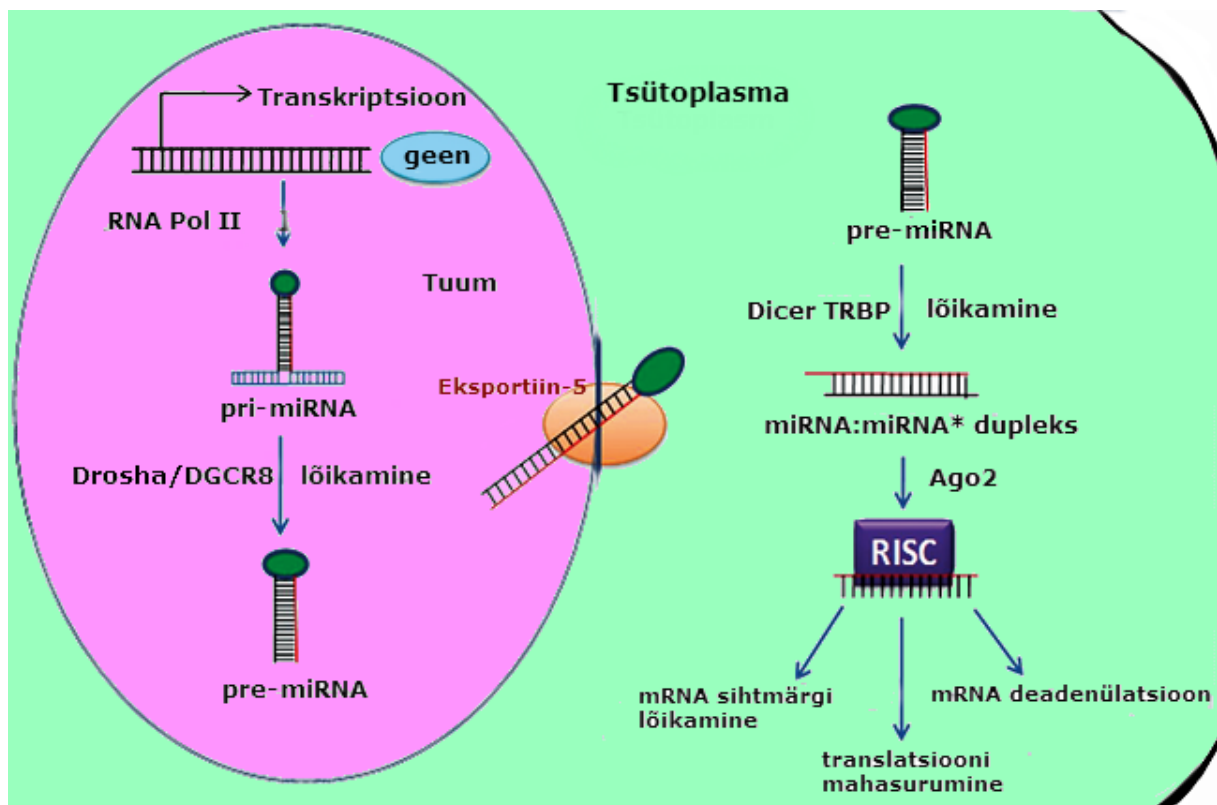
miRNA-de sünteesirada on imetajatel mitmeastmeline protsess (Joonis 1). See algab rakutuumas, kus miRNA geen transkribeeritakse RNA polümeraas II (või erandjuhtudel polümeraas III) poolt. Selle tulemusena moodustub algne transkript ehk primaarne-miRNA (pri-miRNA), mis on kuni mitu tuhat nukleotiidi pikk (Lee Y jt., 2004). Pri-miRNA-d võivad pärineda ka valku kodeerivate geenide intronidest (Carthew RW. ja Sontheimer EJ, 2009). Kanoonilises miRNA sünteesirajas toimub pri-miRNA töötlemine kahes etapis ning seda katalüüsivad kaks RNA-as III perekonna ensüümi Drosha ja Dicer, mis töötavad koos dsRNA-seonduvate valkudega (dsRBP, *double-stranded RNA-binding protein*). Imetajatel on nendeks DGCR8 ja transaktivatsioonitundlik (TAR, *transactivation-responsive*) RNA seonduv valk TRBP (Krol J jt., 2010).

Pri-miRNA töötlemise esimene etapp toimub rakutuumas, kus see seondub pri-miRNA-

mikroprotsessor kompleksiga ning seejärel lõigatakse spetsiifilise Drosha-DGCR8 (Pasha) kompleksi poolt väiksemaks, ~70 nukleotiidi pikkuseks juuksenõela sarnaseks struktuuriks ehk prekursor-miRNAks (pre-miRNA) (Denli AM jt., 2004; Gregory RI jt., 2004; Lee Y jt., 2003). Töötlemise teises etapis transporditakse pre-miRNA tuumamembraani valgu eksportiin-5 vahendusel tsütoplasmasse, kus Dicer lõikab sellest TRBP kaasabil välja 19-23 aluspaari pikkuse miRNA/miRNA\* dupleksi (Yi R jt., 2003). Tekkinud dupleks seotakse helikaasi poolt lahti küpseks miRNAks ja *passenger* ehk *star*-järjestuseks (miRNA\*). Samas on viimastel aastatel selgunud, et miRNA ahelate jagamine funktsionaalseks ning eeldatavasti lagundatavaks *passenger*-ahelaks ei ole korrektne, kuna sõltuvalt koest ning rakutüübist võivad funktsionaalset rolli omada mõlemad ahelad. Järgmisena seotakse küps miRNA mitmest valgust koosnevasse struktuuri ehk RISC (RNA-induced silencing complex) kompleksi.

Imetajatel koosneb RISC kompleks peamiselt AGO (Argonaute) perekonda kuuluvatest valkudest. Samuti sisaldab see ka valke, mis on vajalikud transkriptsiooni modulatsiooniks ja repressiooni indutseerimiseks (Chiang H jt., 2010; Ghildiyal M jt., 2010; Okamura K jt., 2009).

miRNA toimib RISC kompleksis giidmolekulina, seondudes sihtmärk-mRNA 3'-UTRile (Schwarz DS jt., 2003). Selle seondumise tulemusena toimub geeniekspressiooni reguleerimine translatsiooni repressiooni või mRNA lagundamise kaudu (Filipowicz W, 2005).



**Joonis 1.** miRNA biogenees.

Tuumas transkribeeritakse miRNA geenilt RNA polümeraas II abil pri-miRNA, mida seejärel lõigatakse mikroprotsessor kompleksi poolt, kuhu kuuluvad Drosha ja DGCR8. Selle tulemusena moodustub pre-miRNA. Järgnevalt viib eksportiin-5 pre-miRNA tuumast välja tsütoplasmasse, kus see lõigatakse Dicer'i poolt ning moodustub miRNA-miRNA\* dupeks. Küps miRNA seondub RISC kompleksiga, kus miRNA toimib giidmolekulina, juhtides kompleksi sihtmärk-mRNA 3' UTR järjestusele. Selle seondumise tagajärjel toimub kas mRNA translatsiooni mahasurumine või mRNA lagundamine (modifitseeritud Javed A jt., 2013 järgi).

### **1.3. miRNAde toimemehhanism.**

miRNAd moodustavad olulise geeniekspressiooni regulaatorite klassi tänu oma võimele moduleerida ekspressiooni ilma seda täielikult maha surumata. Tänapäevaks on avastatud rohkem kui 1000 inimese miRNAd (Griffiths-Jones S jt., 2008) ning ennustatud rohkem kui 45000 3'-UTRis asuvat miRNA seondumissaiti. Samuti reguleerivad miRNAd rohkem kui 60% inimese valku kodeerivaist geenidest. Hinnatakse, et loomadel on miRNAde sihtmärgiks ligikaudu 30% geenidest (Javed A jt., 2013; Friedman RC jt., 2009; Pasquinelli AE, 2012).



Samuti võib üks geen olla reguleeritud mitme miRNA poolt ning ühel miRNAl võib olla mitu sihtmärki. Ühel miRNA perekonnal võib olla aga kuni 500 sihtmärkgeeni (Garzon R jt., 2010).

Sihtmärgiga seondumine toimub RISC kompleksis, komplementaarsuse alusel miRNA 5'otsa, (nn *seed*- regioon, 2.-8. nukleotiid) ja sihtmärk-mRNA 3'UTR'i vahel (Lewis BP jt., 2003). Kui toimub miRNA ja mRNA täielik paardumine, algatab RISC mRNA degradatsiooni (Bartel DP, 2009). Mittekorrektse paardumise korral surutakse esmalt alla valgu translatsioon, millele võib järgneda ka mRNA lagundamine või isoleerimine translatsioonilisest aparaadist (Djuranovic S jt., 2012; Jidong L jt., 2005). Enamik loomseid miRNAsid paarduvad sihtmärgiga mittetäielikult, seega kehtib translatsioonilise inhibeerimise mehhanism paljude miRNAde kohta. See mehhanism viib valgu taseme muutumisele, mis omakorda võib reguleerida näiteks rakkude proliferatsiooni või apoptoosi (Haifeng D jt., 2012).

#### **1.4. miRNA ja vähk.**

Vähk on multifaktoriaalne haigus, mille üheks põhjuseks on geeniekspressiooni häirumine mutatsioonide või genoomsete ümberkorralduste tagajärjel. Mitmed uuringud on näidanud, et miRNA del on oluline roll vähi patogeneesis. miRNA d osalevad vähirakkudes häirunud protsesside regulatsioonis, nagu näiteks proliferatsioon, differentseerumine ja apoptoos (Kloosterman WP ja Plasterk RH, 2006). miRNA d reguleerivad vähi molekularseid signaaliradasid, toimides tuumorsupressori või onkogeeni (Javed A jt., 2013). Kasvaja teket mahasuruvad miRNA d võivad funktsioneerida proto-onkogeensete geenide allareguleerimise kaudu (Yanaiharu N jt., 2006).

Esimest korda seostati miRNA d vähi patogeneesiga 2002. aastal, kui 13q14 regioonis kirjeldati kaks miRNA d (*miR-15a* ja *miR-16-1*). See kromosomaalne regioon on deleteerunud ligikaudu 69% kroonilise lümfotsüütse leukeemia (CLL) juhtudel ning viib nende kahe miRNA kadumisele (Calin GA jt., 2002). Kuna üheks *miR-15/16* sihtmärgiks on antiapoptootiline faktor *Bcl-2*, siis *miR-15/16* deletsioon võib selgitada *Bcl-2* ülesregulatsiooni kasvaja (Calin GA ja Croce CM, 2006).

Kromosomaalsed regioonid, kus asuvad miRNA d, võivad vähi arengus amplifitseeruda, osaledes kasvaja supressor-geeni negatiivses regulatsioonis. Tulemuseks võib olla miRNA ekspressiooni tõus ning sellest tulenevalt tuumorsupressor-geeni vaigistamine. Onkogeene repressivad miRNA d paiknevad sageli fragiilsetes lookustes, kus võivad tekkida

deletsioonid või mutatsioonid. See võib põhjustada miRNA taseme languse ja onkogeense sihtmärk-geeni üleekspressiooni (Iorio MV ja Croce CM, 2011).

### **1.5. *miR-34* perekond.**

Inimese miR-34 perekonda kuulub kolm miRNAd: *miR-34a*, *miR-34b* ja *miR-34c*. Küps *miR-34a* järjestus koosneb 22 nukleotiidist ning tal on suur sarnasus *miR-34b* (86%) ja *miR-34c*-ga (82%). *miR-34b* ja *miR-34c* on 23 nukleotiidi pikkused ja nende vahel on 83% sarnasust. Tänu homoloogsusele kontrollivad miR-34 perekonna esindajad suuresti samu geene ning on funktsionaalselt sarnased (He L jt., 2007). Inimese normaalses koes on valdav *miR-34a* ekspressioon ning enamikutes kudedes on endogeense *miR-34b/c* tase madal, välja arvatud kopsus, munasarjas, testises ja hingetorus<sup>2</sup> (Hsu SD jt., 2008; Bommer GT jt., 2007).

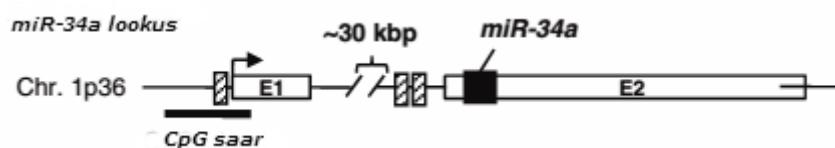
#### **1.5.1. *miR-34a* vähi biogeneesis**

*miR-34a* on miR-34 perekonna esindaja, mis reguleerib mitmeid rakutsükli, apoptoosi ja proliferatsiooniga seotud geene. Ta paikneb regioonis 1p36.23 (joonis 2), mille deleteerumine viib sageli vähi tekkimisele (Calin GA jt., 2004; Wiggins JF jt., 2010). Teiseks mehhanismiks, mis viib *miR-34a* ekspressiooni vähenemisele erinevates vähitüüpides, on *miR-34a* promootori sage hüpermetülatsioon (Lodygin D jt., 2008).

*miR-34a* ekspressioon on vähenenud erinevates vähitüüpides, nagu näiteks neuroblastoom (Welch C jt., 2007), lümfoom (Craig VJ jt., 2012; Sotillo E jt., 2011), eesnäärme- (Bagchi A ja Mills AA, 2008; Fujita Y jt., 2008), rinnanäärme- (Vogt M jt., 2011) ja kopsuvähk (Gallardo E jt., 2009), aga samuti ka ateroskleroosilistes kardiovaskulaar-haigustes (Zhao T jt., 2010) ja mitmete teiste haiguste korral.

---

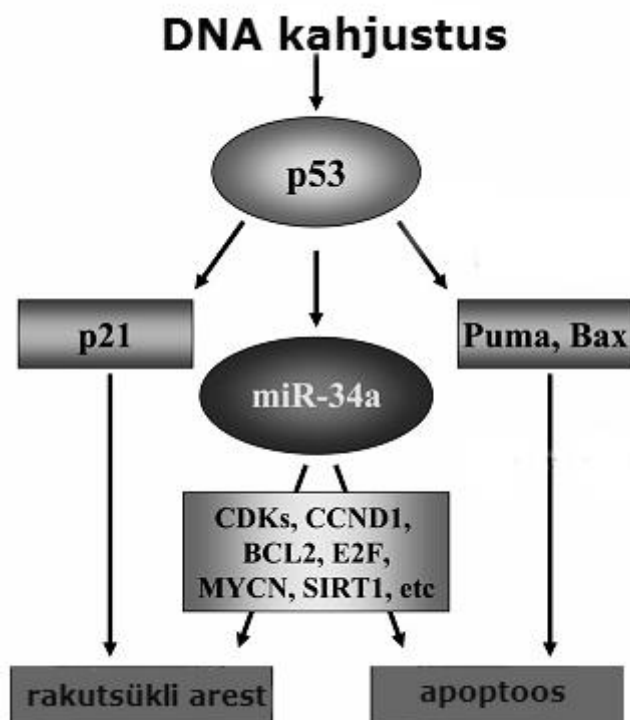
<sup>2</sup> <http://miRNAmap.mbc.nctu.edu.tw/>



**Joonis 2.** Inimese *miR-34a* geeni struktuur (modifitseeritud Hermeking H, 2010 järgi).

Mustad ja valged kastid tähistavad vastavalt eksoneid ja *miR-34a* juuksenõela struktuuri. Viirutatud kastid tähistavad p53 seondumiskohta. CpG saareke on näidatud musta joonega.

*miR-34a* võib maha suruda erinevaid onkogeenseid protsesse, reguleerides mitmeid rakuliste signaaliradade geene. Samuti on ta tugevas seoses p53 valguga ning võib otseselt indutseerida p53 aktivatsiooni. p53 on transkriptsioonifaktor, mille üheks funktsiooniks on rakutsükli ja apoptoosi regulatsioon (joonis 3). Ta on kodeeritud *TP53* (*tumor protein 53*) geeni poolt, mille mutatsioonid on sageli kasvaja tekkimise põhjuseks (Hermeking H, 2007 ; Bommer GT jt., 2007; Raver-Shapira N jt., 2007; May P ja May E, 1999). Lisaks rakutsükli regulatsioonile toimib p53 valk tuumorsupressorina, samuti kontrollib rakkude proliferatsiooni ja rakkude vananemist ning mõjutab kemoresistentsuse teket (Lodygin D jt., 2008; Zilfou JT ja Lowe SW, 2009).



**Joonis 3.** *miR-34a*/p53 regulatoorne võrgustik (modifitseeritud Zenz T jt., 2009 järgi).

DNA kahjustus põhjustab p53 valgu aktiveerumise. See viib rakutsükli arestini p21 ning apoptoosi erinevate sihtmärkide (nagu näiteks *PUMA*) kaudu. *miR-34a* on p53 otsene sihtmärk ning funktsionaalses p53 rajas on ta on p53 poolt reguleeritud. *miR-34a* indutseerib rakusurma rakutsükli aresti ja apoptoosi kaudu, surudes maha oma sihtmärke nagu *CDK4/6*, *MYCN*, *Bcl-2*, ja *SIRT1*.

### **1.5.2. *miR-34a* ja rakutsükkel.**

Peamised *miR-34a* funktsioonid sõltuvad rakulisest kontekstist, indutseerides rakkude proliferatsiooni, rakutsükli aresti või apoptoosi. Näiteks *miR-34a* ebanormaalne ekspressioon võib inhibeerida rakkude kasvu kahekordsel määral (Lodygin D jt., 2008) ning viia G1/G2 faasi arestile (He L jt., 2007; Chen F ja Hu SJ, 2012).

Mitmete uuringute käigus on eksperimentaalselt valideeritud *miR-34a* rakutsükli reguleerivaid sihtmärkgeene. Mõned nendest viivad S faasis olevate rakkude hulga vähenemisele või G0/G1 faasis olevate rakkude hulga suurenemisele. Samuti on mitu sihtmärkgeeni seotud G1/S ülemineku rajaga (Hermeking H, 2010; Fujita Y jt., 2008; Li N jt., 2009). Näitena võib tuua *CCNE2*, *CDK4/6* ja *MET*, mis mõjuvad G1 faasist S faasi üleminekule. Nende vaigistamine indutseerib rakutsükli G1 faasi aresti (Chen F ja Hu SJ, 2012).

Mitmed uuringud on näidanud, et *miR-34a* on ülesreguleeritud rakkude vananemise protsessis, näiteks replikatiivsel vananemisel, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-põhjustatud enneaegsel ning onkogeenide poolt põhjustatud vananemisel (Christoffersen NR jt., 2010).

*miR-34a* võib indutseerida rakulist vananemist mitmete radade kaudu, millest enim tunnustatud on *p53-miR34a-SIRT1* rada (Zhao T jt., 2010). *SIRT1* kuulub klass III histooni deatsetülaaside hulka ja reguleerib rakutsükli ja rakulist vananemist valkude deatsetüleerimise kaudu. Nende valkude hulka kuuluvad näiteks p53, Foxo ning Ku70 (Chen F ja Hu SJ, 2012).

### **1.5.3. *miR-34a* ja apoptoos.**

Apoptoos on programmeeritud rakusurm, mida indutseeritakse kaspaas-vahendatud apoptoosi raja aktiveerimise kaudu (Welch C jt., 2007) ning mis on reguleeritud p53 valguga poolt, mis akumulereb stressi korral tuumas ja aktiveerib mitmeid geene (Zilfou JT ja Lowe SW, 2009). Peamiselt toimib p53 transkriptsioonifaktorina erinevate effektorite puhul, sealhulgas proapoptootilised valgud Puma (*in. k. p53 upregulated modulator of apoptosis*), Noxa (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) ja Bax (*bcl-2-like protein 4*) ning lisaks ka rakutsükli inhibiitor *p21* (Hermeking H, 2010; Concepcion CP jt., 2012).

*miR-34a* inhibeerib *Bcl-2* ja surviviini (*BIRC5. in. k. baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*) (Shen Z jt., 2012; Hermeking H, 2010). Samuti võib *miR-34a*

stimuleerida endogeense p53 aktiivsust positiivse tagasiside mehhanismi kaudu. *miR-34a* sihtmärkideks on *SIRT1* (*silent information regulator 1*) ja *YY1* (*yin yang 1*), valk, mis seob p53 ja aktiveerib p53 ubikvitineerimist ja degradatsiooni (Chen QR jt., 2011; Nobuhiro O jt., 2014). Seega võib oletada, et need signaalid on vajalikud *miR-34a* ekspressiooni taseme hoidmiseks ning p53 poolt kasvaja supressiooni radade aktivatsiooniks. Mitmed uuringud on näidanud, et *miR-34a* on võimeline inhibeerima vähirakke ka endogeense p53 puudumisel (Christoffersen NR jt., 2010; Wiggins JF jt., 2010).

### **1.6. *miR-34a* vähiteraapias**

MiRNAde uurimine on andnud tõuke uute ravimite arendamiseks (Bader AG jt., 2011). miRNAde rakendamine terapeutilistel eesmärkidel hõlmab peamiselt haigus-seoseliste miRNAde ekspressiooni mõjutamist antagonistide või "miimikute" abil. Termin „miRNA asendusteraapia“ tähistab vähirakkudes allareguleeritud miRNAde asendamist ning selle kaudu vastavate rakuliste signaalradade aktiveerimist (Wiggins JF jt., 2010).

Kuna *miR-34a* tase vähirakkudes on sageli langenud, katsetatakse tema toimet asendusteraapias (Kasinski AL ja Slack FJ, 2011). Viimased saavutused keemiliste modifikatsioonide uurimisel on näidanud *miR-34a* terapeutilist efektiivsust *in vivo* katsetes. Kuigi *miR-34a* aktiivsuse hindamine loomadel on seotud *in vivo* kudedesse toimetamise meetodi efektiivsusega, illustreerivad mitu näidet selle terapeutilist potentsiaali (tabel 1).

**Tabel 1.** *miR-34a* terapeutiline aktiivsus loomudelitel (modifitseeritud Bader AG, 2012 järgi).

Vähitüüp	Kasutatud hüireliinid	Effekt (TGI)*	Viide
Kopsuvähk	H460	~78% TGI	(Wiggins JF jt., 2010)
	KRAS G12D GEMM	~60% TGI	(Trang P jt., 2011)
Eesnäärme vähk	PC-3	~50% TGI	(Liu C jt., 2011)
	LAPC9	~20% TGI	(Liu C jt., 2011)
Kõhunäärme vähk	MiaPaca-2	~68% TGI	(Pramanik D jt., 2011)
Lümfoom	U2932	~76% TGI	(Craig VJ jt., 2012)
Hulgimüeloom	SCID	~60% TGI	(Di Martino MT jt., 2014)

\*Tuumori kasvu inhibeerimise efektiivsuse (*tumor growth inhibition*, TGI) osakaal, mida väljendatakse kasvajakoe mahu võrdlusega *miR-34a*'ga ravitud ja kontroll-loomade vahel. 100% TGI näitab täieliku kasvaja arengu inhibeerimist.

*miR-34a* teraapia oluliseks piiranguks on tema ebastabiilne molekulaarne struktuur. Praegu on kasutusel kaks viisi, kuidas saavutatakse *miR-34a* stabiilne ekspressioon *in vivo*. Nanotehnoloogiliste meetodite abil rakendatakse teraapias nn nanokandjaid (in. k. *nanocarriers*), mis tõstavad RNA stabiilsust (De Rosa G jt., 2010). Nanopartiklid sisaldavad ~19-23 nukleotiidi pikkusi kaheahelalisi miRNA miimikuid mis viiakse looma organismi sabaveeni kaudu (Wiggins JF jt., 2010). Samuti kasutatakse vektor-süsteeme, mille funktsioon on sarnane traditsioonilise geeniteraapiaga (Qiu X jt., 2011). Samuti rakendatakse ka nn orgaanilisi kandjaid. Need on kandjad, mida iseloomustavad biokokkusobivus ja parandatud ravimi kandevõime. Selliste kandjate hulka kuuluvad neli peamist rühma: liposoomid, mitsellid, valgu või peptiididel põhinevad nanokandjad ja dendrimeerid. Liposoomid ja mitsellid on kahekihilised fosfolipiidsed struktuurid, mis seonduvad oligonukleotiididega ja moodustavad nendega komplekse. Nad on head ravimi nanokandjad ning nende orgaaniline olemus vähendab oluliselt toksilisust (López-Dávila V jt., 2012).

Samuti on katsetatud ka neutraalse lipiidse emulsiooni (NLE) partikleid, mille suurus on mõõdetav nanomeetrilises skaalas Näiteks katsetati *miR-34a*/NLE kompleksi H460 ja A549 kopsuvähi ksenograftidega hiirtel. Hiirtele süstiti veenisiseselt *miR-34a* miimikut ning tulemusena saadi kasvaja supressiooni kuni 78% (Wiggins JF jt., 2010). Samuti näitas *miR-34a*/NLE kompleks oma tõhusust hiirtel, kellele oli siirdanud eesnäärme kasvaja rakke. Kasvajate mahasurumine ulatus kuni 50%-ni (Liu C jt., 2011).

*MiR-34a* miimiku puudusteks on võimalikud kõrvaltoimed ja toksiline efekt. Siiski on teada, et NLE-kapseldatud *miR-34a* miimik ei oma sellist toimet ning ei põhjusta mittespetsiifilist immuunvastust (Wiggins JF jt., 2010).

*miR-34a*<sup>1</sup> põhinev vähiteraapia sõltub rakkudesse toimetamise süsteemi kliinilisest kasulikkusest. Paljud katseloomadel tõestatud tehnoloogiad on lootustandvad, kuid nad ei ole tehnoloogiliselt piisavalt täiuslikud, et näidata stabiilsust ning kontrollitud kvaliteeti kliiniliste katsete alustamiseks (Bader AG, 2012).

Firma Mirna Therapeutics<sup>3</sup> tegeleb paljude mikroRNA miimikute rakkudesse viimise mehhanismide uurimisega. Praegu katsetatakse üheksat terapeutilist kandidaati ning kõige tõhusam on MRX34. See on liposoomi kapseldatud *miR-34* miimik, mille rakkudesse viimiseks kasutatakse firmas Marina Biotech välja töötatud tehnoloogiat NOV340 SMARTICLE (Bader AG, 2012). See on partikleid moodustav liposoom diameetriga 120 nm. Ta sisaldab amfoteerseid lipiide, mis on katioonsed madalama pH korral ning anioonsed neutraalse ja kõrgema pH korral<sup>4</sup>. Liposoomi moodustamiseks oli segatud lipiidid ja *miRNA* miimikud kokku. *miRNA* tõhusaks kapseldamiseks toimub segamine happelistes tingimustes. Bioloogilises vedelikus muutuvad nanopartiklid kergelt anioonseks. See aitab endoteelis või teistes kudedes ära hoida soovimatuid interaktsioone negatiivselt laetud membraaniga. Kui kasvajas hakkab pH langema, siis selles piirkonnas muutuvad NOV340 partiklid katioonseks ning kinnituvad kasvaja rakkudele (Bader AG, 2012).

MRX34 on esimene tehnoloogia, mida hakati katsetama I faasi kliinilistes maksavähiga seotud uuringutes 2013. aasta aprillis<sup>5,6</sup>. 8. aprillil 2014 ilmusid nende katsete esimesed tulemused mis väidavad, et MRX34 on üldiselt ohutu ning ainult ühel patsiendil ilmn

---

<sup>3</sup> <http://www.mirnarx.com/>

<sup>4</sup> <http://rnaitherapeutics.blogspot.com/2013/04/mirna-therapeutics-brings-first.html>

<sup>5</sup> [http://www.mirnarx.com/\\_\\_\\_Pipeline/Pipeline.aspx](http://www.mirnarx.com/___Pipeline/Pipeline.aspx)

<sup>6</sup> <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01829971>

toksiline effekt<sup>7</sup>.

---

<sup>7</sup> [http://www.mirnarx.com/pdfs/Mirna\\_AACR\\_release\\_20140408\\_FINAL.pdf](http://www.mirnarx.com/pdfs/Mirna_AACR_release_20140408_FINAL.pdf)



## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Eesmärgid**

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on uurida sünteetilise *miR-34a* miimiku toimet hoolikalt valitud sihtmärkgeenide ekspressioonile PC-3 rakuliinis ning hinnata sellise katsesüsteemi kasutatavust *miR-34a* asendusravi väljatöötamisel.

### **2.2. Materjal ja metoodika**

#### **2.2.1. Kasutatud rakuliinid ja söötmed.**

Käesolevas töös kasutati inimese eesnäärmevähi rakuliini (PC-3 (*prostate cancer*)). Rakke kasvatati 6 cm tassidel termostaadis DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit ning 1% penitsiliini ja streptomütsiini lahust (PAA Cell Culture Company) (T=37°C, CO<sub>2</sub> 5%).

Rakkude paljundamiseks aspireeriti sööde, pesti rakke 1 ml 1-kordse PBS (*Phosphate Buffered Saline*) puhvriga. Järgmisena lisati 1 ml 1-kordset trüpsiini lahust ning inkubeeriti 1-3 minutit toatemperatuuril. Seejärel lisati söödet trüpsiini inibeerimiseks ning rakud suspendeeriti ja kanti 5-10 korda lahjendatult uuele Petri tassile.

#### **2.2.2. Rakukultuuri transfektsioon.**

miRNA transfekkeerimiseks rakkudesse kasutati *siPORT*<sup>TM</sup> *NeoFX*<sup>TM</sup> transfektsiooni agenti (Invitrogen) ja *miRIDIAN*<sup>TM</sup> mikroRNA miimikuid: *miR-34a* miimik ja negatiivseks kontrolliks *cel-miR-67* miimik.

Iga transfektsiooni kohta lahjendati 1 µl *siPORT* transfektsiooni agenti 25 µl *Opti-MEM*<sup>®</sup> *medium*'is ja 0.75 µl (20 µM) *miR-34a* miimikut 25 µl *Opti-MEM*'is ja inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Samuti lahjendati ka negatiivne kontroll-miimik (*cel-miR-67*). Seejärel segati kokku *siPORTi* ja miimikute lahused ja inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Saadud transfektsiooni kompleks tilgutati 24-kannulisele koekultuuri plaadile kolmes korduses

vastavalt transfektsiooni protokollile. Reaktsiooni lõppmaht oli 500 µl ning miimiku lõppkontsentratsioon 30 nM. Inkubeerimine kestuseks oli 6, 24 ja 48 tundi 37 °C juures.

Ühes transfektsioonikatses olid järgmised katsepunktid:

3 kannu: transfekkeerimata PC-3 rakud,

3 kannu: sünteetilise *miR-34a* miimikuga transfekkeeritud rakud,

3 kannu: ilma miimikuta transfekkeeritud rakud

3 kannu: sünteetilise *cel-miR-67* miimikuga transfekkeeritud rakud

### **2.2.3. RNA eraldamine.**

Totaalse RNA eraldamiseks kasutati *miRNeasy Mini kit*'i (Invitrogen). RNA eraldamine toimus tootja protokoll järgi. Rakud lüüsi QIAzol Lysis Reagentiga. Selleks lisati igasse kannu 700 µl *QIAzol Lysis Reagent*'i, inkubeeriti toatemperatuuril 5 min ning tõsteti lüüsitud rakud uude tuubi. Igasse tuubi lisati 140 µl kloroformi, raputati 15 sek, inkubeeriti toatemperatuuril 2-3 min ja tsentrifuugiti (13000 x g, 15 min 4 °C). Ülemine vedeliku faas tõsteti uue tuubi, lisati 525 µl 96% etanooli ja segati hoolikalt. Seejärel tõsteti 700 µl proovi *RNeasyMini spin* kolonni, tsentrifuugiti (8000 x g, 15 sek) ning korrati seda etappi veel kord. Järgmisena lisati kolonni 700 µl *RWT* puhvrit ning tsentrifuugiti 8000 x g juures 15 sek. Pärast seda lisati 500 µl *RPE* puhvrit ning tsentrifuugiti (8000 x g). Seda etappi korrati 2 korda: esimene kord tsentrifuugiti 15 sek ja teine kord 2 min. Järgmisena tõsteti kolonnid uude tuubi ning kuivatati proovid, tsentrifuugides need 13000 x g juures 1 min. RNA elueeriti 50 µl'i MQ veega, tsentrifuugides 8000 x g juures 1 min.

Eraldatud totaalne RNA säilitati 1,5 ml tuubides -80°C juures.

### **2.2.4. RNA kontsentratsiooni mõõtmine.**

Totaalse RNA kontsentratsiooni mõõdeti Nanodrop-1000 (*Thermo Scientific*) spektrofotomeetriga. Mõõtmiseks võeti 1 µl vees lahustatud totaalset RNAd. Lahuse absorptsiooni mõõdeti 230, 260 ja 280 nm juures. Rakukultuuri RNAd kontsentratsioonid jäid vahemikku 27,3-215,5 ng/µl.

## **2.2.5. Kvantitatiivse reaalaaja PCR-ga seotud katsed.**

### **2.2.5.1. miR-34a transfektsiooni kontroll.**

#### **A. Cdna süntees TaqMan süsteemi kasutamisel.**

Proovidest eraldatud totaalse RNA põhjal sünteesiti cDNA *First Strand Synthesis Kit*'i (*Thermo Scientific*) ja kommertsiaalsete miRNA praimerite abil vastavalt tootja protokollile (*Applied Biosystems*). cDNA sünteesis kasutati 1 µl RNAd. Reaktsiooni lõppmahuks oli 10 µl, millest 6 µl kasutati pöördtranskriptsioonile järgneva qPCRi reaktsiooni segudes. cDNA sünteesi reagentid ja programm on toodud tabelites 2 ja 3.

**Tabel 2.** cDNA sünteesi reaktsiooni komponendid.

Reagent	Maht 1x segus (µl)
5x reaktsiooni puhver 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT	2
RiboLock RNAasi inhibiitor (20 U/µl)	0,5
10 mM dNTP mix	1
M-MuLV pöördtranskriptaas (20 U/µl)	1
RT praimer	1
MQ vesi	3,5
RNA	1
Kogumaht	10

**Tabel 3.** cDNA sünteesi programm.

Temperatuur °C	Aeg (min)
16	30
42	30
85	5
4	∞

### **B. Kvantitatiivne reaalaaja PCR**

*MiR-34a* miimiku transfektsiooni kontrolliks kasutati reaalaaja kvantitatiivse PCRi aparatuuri (*ABI Prism 7900HT*, *Applied Biosystems*) ja kommertsiaalseid TaqMan miRNA sonde (*miR-34a* (0000268), *RNU48* (002745) ja *let-7a* (0000060))<sup>8</sup> ning TaqMan reagente vastavalt tootja protokollile (*Applied Biosystems Inc*) (tabel 4). Kõik reaktsioonid viidi läbi kolmes korduses 384-kannulises plaadis (*MicroAmp*, *Applied Biosystems*) vastavalt tootja poolt soovitatud programmile (tabel 5). Iga reaktsiooni lõppmahuks oli 10 µl. Potentsiaalse kontaminatsiooni tuvastamiseks viidi läbi negatiivse kontrolli reaktsioonid kuhu ei olnud lisatud cDNAd.

**Tabel 4.** Reaalaaja qPCRi reaktsiooni segu.

Reagent	Maht 1x segus (µl)
5X Hot Firepol probe qPCR mix	2
TaqMan miRNA assay	0,3
MQ vesi	6,7
cDNA	1
Kogumaht	10

<sup>8</sup> <http://www.lifetechnologies.com/>

**Tabel 5.** Reaal-aja qPCRi programm.

Temperatuur °C	Aeg	Tsüklite arv
95	15 min	1
95	15 sek	40
60	1 min	1
4	∞	

#### **2.2.5.2. MiR-34a sihtmärkgeenide ekspressiooni uurimine.**

##### **A. miR-34a sihtmärkgeenide valimine ja praimerite disain.**

*miR-34a* sihtmärkgeenide leidmiseks kasutati *on-line* andmebaase (*MirWalk*, *TarBase*, *MirTarBase* ja *StarBase*). Välja valiti 5 geeni, mis olid eksperimentaalselt kinnitatud ning sihtmärkidena mainitud vähemalt kolmes andmebaasis: *MET*, *E2F3*, *CDK6*, *SIRT1* ja *Bcl-2*.

Sihtmärkgeenide suhtes praimerite disainimiseks identifitseeriti kõigepealt *GenomeBrowser* andmebaasi kasutades geenide eksonid. Praimerid disainiti *Primer3* programmi abil<sup>9</sup> vastavalt järgnevatele parameetritele:

- GC sisaldus: 30-60%
- Pikkus: 18-30 nukleotiidi
- Optimaalne sulamistemperatuur: 60°C.

Tulemusena saadi praimerite järjestused, mis on toodud tabelis 6.

---

<sup>9</sup> [www.frodo.wi.mit.edu](http://www.frodo.wi.mit.edu)

**Tabel 6.** Sihtmärkgeenide ekspressiooni uurimiseks kasutatud praimerite järjestused.

<b>Geen</b>	<b><i>Forward-praimer</i></b>	<b><i>Reverse-praimer</i></b>
<b>SIRT1</b>	5'-ATACTGATTACCATCAAGCCG-3'	5'-TGCTGAACAGATGGAAAATCC -3'
<b>E2F3</b>	5'-GAAGCCAAGTCTTTGGAAGC -3'	5'-AGGGCCCATTGAGGTTTACT-3'
<b>CDK6</b>	5'-GGGTTAAATGTCAAACACTTCAG-3'	5'- TGATTGGACTCCCAGGAGAA -3'
<b>BCL2</b>	5'- TACAGTTCCACAAAGGCATCC -3'	5'-GAGGATTGTGGCCTTCTTTG-3'
<b>MET</b>	5'- CAATATCATTTCCCTTAATTTCCAG-3'	5'- TACCACTCCTTCCCTGCAAC-3'
<b>GAPDH*</b>	5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'	5'-CCATCACGCCACAGTTTCC-3'
<b>18S*</b>	5-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
<b>ACTB*</b>	5-' AGGCACCAGGGCGTGAT-3'	5'-CCCACATAGGAATCCTTCTGA-3'

\* geenid, mida kasutati endogeensete referentsidena.

### **B. Praimerite kontroll.**

Disainitud praimerite kontrolliks sünteesiti eelnevalt eraldatud PC-3 rakuliini totaalsest RNA-st cDNA kasutades *First Strand Synthesis Kit*'i (*Thermo Scientific*). Esiteks segati kokku 9 µl vett ja 1 µl oligo-dT ning 1 µl RNAd. Segu inkubeeriti termostaadis 5 min jooksul 65°C juures. Seejärel lisati 9 µl eelnevalt valmistatud cDNA sünteesi reaktsiooni segu (tabel 7). Reaktsiooni lõppmaht oli 20 µl ning cDNA sünteesi programm on toodud tabelis 8 .

**Tabel 7.** cDNA sünteesi reaktsiooni komponendid.

Reagent	Maht 1x segus (µl)
<b>5x reaktsiooni puhver</b>  250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT	4
RiboLock RNAasi inhibiitor (20 U/µl)	1
10 mM dNTP mix	2
M-MuLV pöördtranskriptaas (20 U/µl)	2
Oligo dT praimerid	1
RNA	1
MQ vesi	9
<b>Kogumaht</b>	<b>20</b>

**Tabel 8.** cDNA sünteesi programm.

Temperatuur (°C)	Aeg (min)
37	60
70	5
4	∞

Pärast cDNA sünteesi valmistati PCR reaktsioonisegu mida inkubeeriti PCR masinas, kasutades nn *touchdown* programmi (praimerite sulamistemperatuuri alandati 10 tsükli jooksul 0.5 °C tsükli kohta). Reaktsiooni lõppmaht oli 25µl ning kõik reagentid koos PCR programmiga on toodud tabelites 9 ja 10.

Saadud PCR reaktsiooni fragmente analüüsiti 2,5%-agaroosgeelil.

**Tabel 9.** PCR reaktsiooni komponendid praimerite kontrolliks

Reagentid	Maht 1x segus (µl)
10x Puhver B (Solis)	2,5
2,5 mM dNTP segu	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
Forward praimer	1
Reverse praimer	1
Hot Fire Taq polümeraas (5 U/µl)	1
MQ vesi	13
cDNA	2
Kogumaht	25

**Tabel 10.** TouchDown PCR programm

Temperatuur (°C)	Aeg (min)	Tsüklite arv
94	15	1
94	30 sek	7
60	30 sek	
72	1	
94	30 sek	30
57	30 sek	
72	1 min	

**C. Kvantitatiivne reaalaaja PCR.**

Sihetmärgkeeni de ekspressioonitaseme mõõtmiseks kasutati kvantitatiivset reaalaaja PCRi (*ABI Prism 7900HT*, *Applied Biosystems*) ja kommertsiaalseid *EvaGreen®* (*Solis BioDyne*)



reagente ning eelnevalt disainitud praimerid (tabel 6) vastavalt tootja protokollile (*Solis Biodyne*) ( tabel 11). Kõik reaktsioonid viidi läbi kolmes paralleelis 384-kannulisel plaadil (*MicroAmp, Applied Biosystems*) vastavalt tootja poolt soovitatud programmile (tabel 12). Iga reaktsiooni lõppmahuks oli 10 µl. Potentsiaalse kontaminatsiooni tuvastamiseks viidi läbi negatiivse kontrolli reaktsioonid kuhu ei olnud lisatud cDNA-d.

**Tabel 11.** Reaal-aja qPCRi reaktsiooni komponendid sihtmärkgeenide ekspressiooni uurimiseks.

Reagent	Maht 1x segus (µl)
<b>5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus</b>	2
<b>Forward praimer</b>	0,5
<b>Reverse praimer</b>	0,5
<b>cDNA</b>	1
<b>Milli-Q vesi</b>	6
<b>Kogumaht</b>	10

**Tabel 12.** Reaal-aja qPCRi programm *EvaGreen®* reagentide jaoks.

Tsükl	Temperatuur (°C)	Aeg (min)	Tsüklide arv
<b>Algne denaturatsioon</b>	95	15	1
<b>Denaturatsioon</b>	95	15 sek	40
<b>Praimeri süntees</b>	60	20 sek	
<b>Elongatsioon</b>	72	15 sek	

### **2.2.6. Reaal-aja qPCRi andmete statistiline analüüs.**

Reaal-aja qPCRi transfektsiooni ja ekspressiooni andmeid analüüsiti SDS 2.2.2. (*Applied Biosystems*) programmi abil. MiRNade ekspressiooni tulemusi analüüsiti kasutades võrdleva lävitsükli ( $C_t$ -cycle threshold) meetodit, mis põhineb fluorestsentsi intensiivsuste erinevustel kontroll- ja uuritava proovi vahel.  $C_t$  on tsüklite arv, mis on vajalik kindla signaalitugevuse läve saavutamiseks. qRT-PCRi andmeid vaadeldi lävitaseme 0,20 suhtes. Sihtmärkgeenide ekspressiooni taseme ja *miR-34a* miimiku toimimise hindamiseks kasutati programmi MS Excel 2010 (Microsoft Corporation).

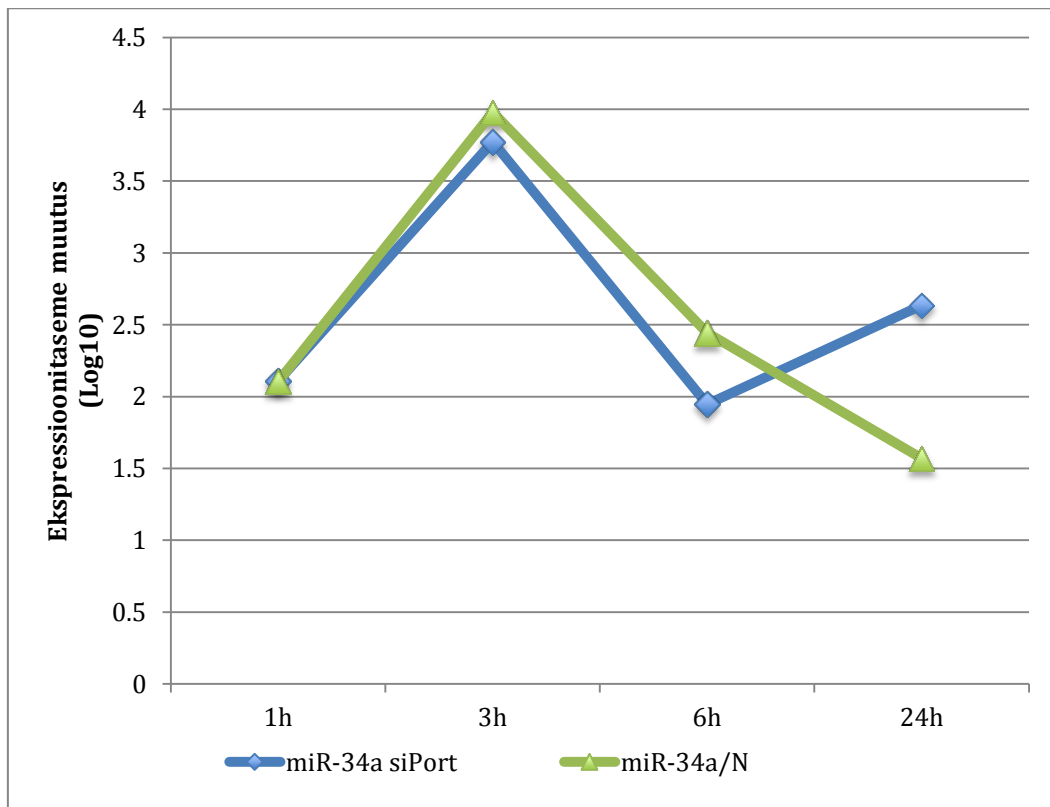
### 3. TULEMUSED JA ARUTELU.

#### 3.1. *miR-34a* miimiku transfektsiooni kontroll.

Eelnevalt oli tuvastatud *miR-34a* suhteliselt madal ekspressioonitase PC-3 rakkudes (U. Võsa, T. Annilo, avaldamata tulemused). *miR-34a* miimiku aktiivsuse kontrollimiseks transfekteeriti PC-3 rakuliini *miR-34a* miimikuga (*miR-34a*-siPort) ning ning mõõdeti *miR-34a* ekspressiooni taset. Võrdluskatseks transfekteeriti parallelselt *miR-34a* miimik ilma siPordita (*miR-34a*/N) ning negatiivseks kontrolliks kommertsiaalne negatiivne kontrollmiimik (negmimic). *miR-34a* ekspressioonitaseme määramiseks kasutati kvantitatiivset real-aja PCRi. Andmete normaliseerimiseks kasutati endogeense kontrollina *let-7a* ning *RNU48*.

Selles katses uuriti kuidas *miR-34a* miimik toimib transfektsiooni jooksul ning tulemuseks saadi, et nii *miR-34a*-siPort'i kui ka *miR-34a*/N puhul oli kõige tugevam *miR-34a* ekspressioonisignaal ajapunktil 3 tundi (Joonis 4). Mõlemal kompleksil oli sarnane ekspressiooni suund ajapunktist 1 tund kuni ajapunktini 6 tundi ning alles viimaseks ajapunktiks (24 tundi) oli nende ekspressioon erinev.

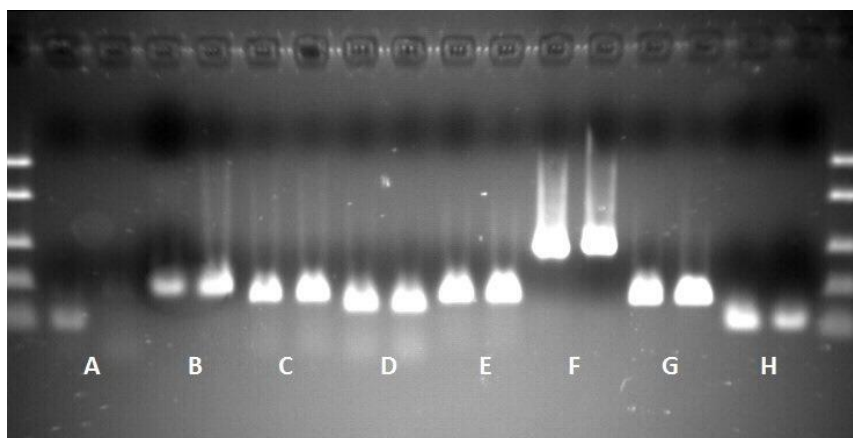
Need tulemused näitavad, et *miR-34a* miimik on ka ilma edasise protsessinguta detekteeritav kasutatud TaqMan assay poolt ning et see miimik on äärmiselt stabiilne, olles detekteeritav koekultuuris ilma transfektsioonikompleksita ka mitme tunni möödudes.



**Joonis 4.** Transfektsioonijärgne *miR-34a* ekspressioonitase. Sinisega on tähistatud *miR-34a* miimik koos siPordiga, rohelise värviga *miR-34a* miimik ilma siPordita.

### 3.2. Sihtmärkgeenide valimine ja praimerite disain.

Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli uurida *miR-34a* sihtmärkgeenide ekspressioonitaset eesnäärmevähi rakkudes (PC-3). Antud uuringu jaoks valitud sihtmärkgeenide suhtes disainitud praimerite kontrollimiseks tehti nn *touchdown* PCRi ning saadudprodukte analüüsiti geelelektroforeesil (joonis 5).



**Joonis 5.** PCR produktide kontrolliks tehtud geelelektroforees.

Joonisel on esitatud *miR-34a* sihtmärkgeenide praimerite PCR produktid. Iga reaktsioon oli tehtud kahes korduses valenegatiivse tulemuse vältimiseks. A. *Bcl-2*; B. *MET*; C. *CDK6*; D. *E2F3*; E. *SIRT1*; F. *GAPDH*; G. *18S*; H. *ACTB*.

### **3.3. Sihtmärkgeenide ekspressiooni analüüs.**

Uurimaks, kuidas mõjutab *miR-34a* miimiku transfektsioon sihtmärkgeenide ekspressiooni, viidi läbi kvantitatiivne reaalaaja PCR. Ekspressioonisignaale määrati transfekteeeritud rakkudes viiel uuritava sihtmärkgeenil: *Bcl-2*, *CDK6*, *SIRT1*, *MET* ja *E2F3*. Kuna ei eksisteeri universaalset endogeenset kontrolli, kasutati selles töös kolme erinevat kontrolli sihtmärkgeenide ekspressiooni hindamiseks: *18S*, *GAPDH* ning *ACTB*. Nende geenide kõrge ja stabiilne ekspressioonitase lubab neid kasutada referentsiks ning neid on kasutatud erinevates vähitüüpides, sealhulgas ka eesnäärmevähil puhul (Pérez S jt., 2007; Liu DW jt., 2005; Vajda A jt., 2013), kus nad on enimkasutatud kontrollid (Ohl F jt., 2005). Selles töös kasutati qPCRi andmete normaliseerimiseks kolme endogeense kontrolli geomeetrilisi keskmist. Omavahel võrreldi *miR-34a* miimiku ja negatiivse kontrollmiimikuga transfekteeeritud rakkude RNAd, kasutades  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  meetodit.

Esimese katsete seeria puhul mõõdeti sihtmärkgeenide ekspressiooni 48 tundi pärast transfektsiooni. Leiti, et *Bcl-2* ekspressioon *miR-34a* miimikuga transfekteeeritud rakkudes oli 1,57 korda madalam kui negatiivse miimikuga transfekteeeritud rakkudes (Joonis 6). Seni on *Bcl-2* ekspressiooni muutust pärast *miR-34a* miimiku transfektsiooni vähe uuritud. Siiski on avaldatud mitu teiste vähitüüpidega seotud tööd, kus on uuritud *miR-34a* toimet. Näitena võib tuua maovähiga seotud töö, kus leiti, et pärast *miR-34a* miimiku transfektsiooni rakkudesse

väheneb *Bcl-2* tase mitu korda (Ji Q jt., 2008). Teiseks näiteks on pankreasevähiga seotud töö, kus *Bcl-2* ekspressioon oli samuti inhibeeritud (Qing Ji jt., 2009). Kuna paljudes töödes on näidatud, et *miR-34a* represseerib *Bcl-2*, siis võib järeldada, et ta on *miR-34a* miimiku poolt allasurutud ka eesnäärmevähi rakkudes.

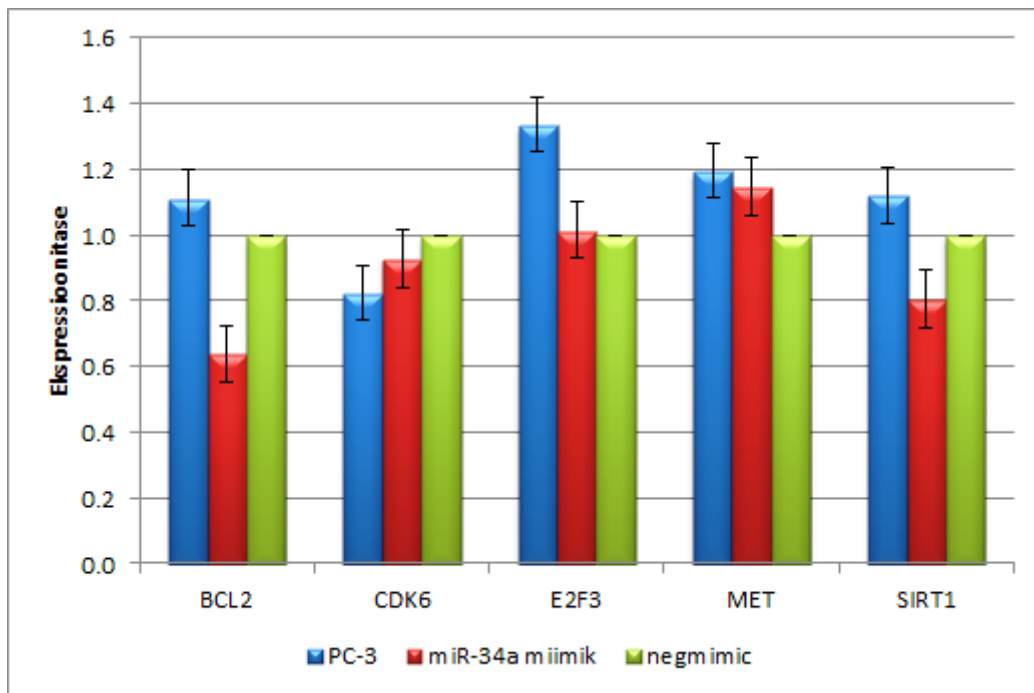
*E2F3* ekspressioon *miR-34a* miimikuga transfekteeritud rakkudes ei olnud statistiliselt oluliselt erinev kontrollmiimikuga transfekteeritud rakkudest. Fujita jt töös näidati, et kuna *E2F3* on seotud p53 valguga ning seoses sellega ka rakutsükli regulatsiooniga, siis tema ekspressioonitase võiks olla samuti allasurutud pärast *miR-34a* miimiku transfektsiooni (Fujita Y jt., 2008).

Käesolevas töös oli *SIRT1* ekspressioon *miR-34a* miimikuga transfekteeritud rakkudes 1,24 korda madalam kui negatiivse kontrollmiimikuga rakkudes. Samas on teised uuringud näidanud *SIRT1* puhul hoopis ekspressiooni ülesreguleeritust, näiteks p53 suhtes mutantsetes eesnäärmevähi rakkudes (Fujita Y jt., 2008; Nanni S jt., 2013). On teada, et *SIRT1* ekspressioon on ülesreguleeritud paljudes vähitüüpides, sealhulgas ka eesnäärmevähis, mis viitab tema olulisusele kasvaja tekkimises (Yamakuchi M, 2012). Nanni jt töös uuriti *SIRT1* rolli eesnäärmevähis ning näidati, et ta võib olla heaks terapeutiliseks sihtmärgiks vanusega seotud haiguste puhul (Nanni S jt., 2013). Samuti näitasid Fujita jt oma uurimuses, et *SIRT1* on ülesreguleeritud PC-3 rakkudes *miR-34a* ekspressiooni mahasurumise ning p53 puudumise tõttu, kuid pärast *miR-34a* miimiku transfektsiooni *SIRT1* ekspressioonitase vähenes. Autorid pakkusid ka välja, et *miR-34a* võib reguleerida *SIRT1* ekspressiooni transkriptsioonilisel ja/või posttranskriptsioonilisel tasemel (Fujita Y jt., 2008).

*MET* ekspressioonitase oli esialgsete tulemuste põhjal *miR-34a* miimikuga transfekteeritud rakkudes 1,15 korda kõrgem võrreldes negatiivse kontrollmiimikuga transfekteeritud rakkudega. *MET* on türosiin-kinaas retseptor, mis osaleb mitmetes vähitekketega seotud signaaliradades ning kuulub ka onkogeenide hulka. Tema ülesekspressioon mõjub kasvaja arengule, metastaaside tekkele ning üldiselt vähi agressiivsusele (McGarty T, 2014). Hwang jt näitasid, et *MET* on p53 oluliseks efektoriks, mis toimib negatiivse regulaatorina. Samuti võib *MET* inhibeerimine olla efektiivseks antimetastaatiliseks lähenemiseks p53 mutatsiooniga seotud vähkide ravimises (Hwang CI jt., 2011). Lisaks sellele näitasid Cheng jt, et *miR-34* perekond kontrollib koostöös p53-ga *MET* ekspressiooni ning reguleerib eesnäärmevähi tüvirakke (Cheng CY jt., 2014).

*CDK6* ekspressioon oli *miR-34a* miimikuga transfekteeritud rakkudes 1,077 korda madalam (Joonis 6) kui negatiivse miimikuga transfekteeritud rakkudes. *CDK6* osaleb rakutsükli

arestis, G1 faasis ning apoptoosis. Mitmed uuringud näitasid tema allareguleeritust erinevates vähitüüpides, näiteks adenokartsinoomis, glioblastoomis ja lümfaatilises metastaaseerumises (Sun F jt., 2008 ; Li Y jt., 2009; Guo Y jt., 2011). Lahknevused *CDK6* ekspressioonis võivad tuleneda erinevatest analüütilistest lähenemistest või siis erinevatest tehnoloogilistest platvormidest. Samuti võib see olla seotud endogeense kontrolli valikuga.



**Joonis 6.** Sihtmärkgeenide ekspressiooni muutus PC-3 rakuliinis 48 tundi pärast *miR-34a* miimiku transfekkeerimist. Sinisega on kujutatud transfekkeerimata rakud; punasega *miR-34a* miimikuga transfekkeeritud rakud; rohelisega negatiivse kontrollmiimikuga transfekkeeritud rakud. Iga katse teostati kolmes korduses ning graafikul on näidatud katsete keskmine. Veapiirid tähistavad standardhälvet.

### 3.4. *miR-34a* sihtmärkide ekspressioon erinevates ajapunktides.

#### 3.4.1. Ajapunktide valimine.

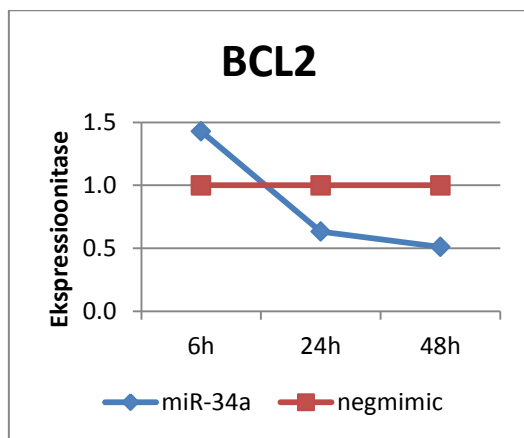
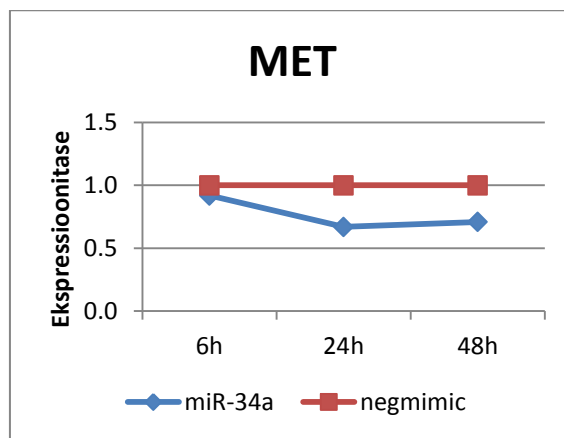
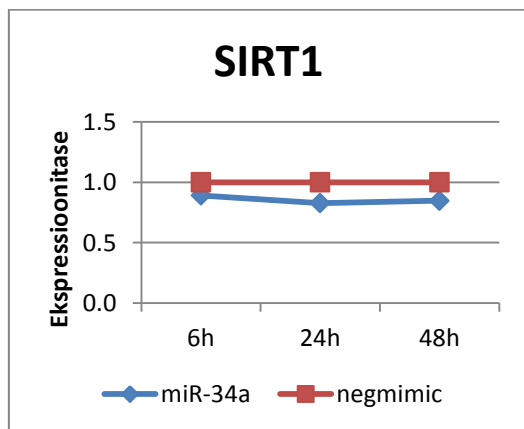
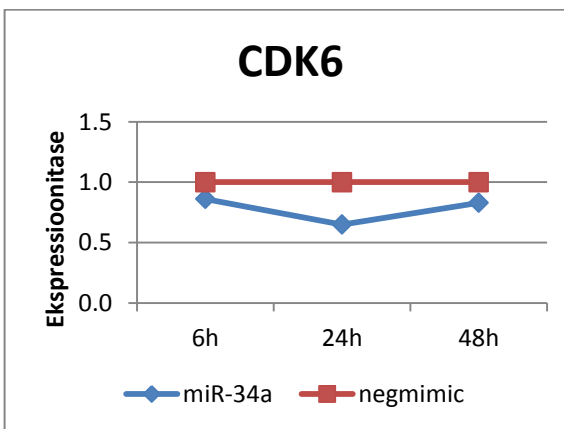
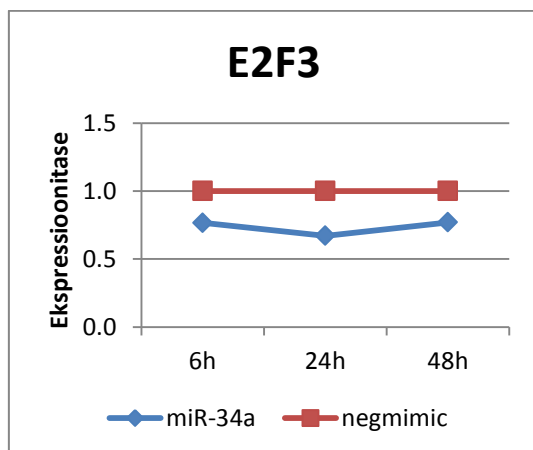
Käesolevas töös uuriti ka *miR-34a* sihtmärkgeenide ekspressiooni muutust mitmes ajapunktis. Kõigepealt koguti andmeid 1 tund, 3 tundi, 6 tundi ja 24 tundi pärast transfektsiooni. Kuna esimese ja kolmanda tunni ajapunktid näitasid minimaalset muutust (va *Bcl-2* puhul), otsustati edasistes katsetes jätta testimiseks ajapunktid 6 ja 24 tundi ning lisada ka 48 tunni ajapunkt.

### **3.4.2. *miR-34a* sihtmärkide ekspressioon erinevates ajapunktides.**

Eelmises katses valitud kolme ajapunkti uurimiseks viidi katsed läbi kolmes korduses. Reaal-aja qPCRi tulemused näitasid suurt erinevust *Bcl-2* ekspressioonis (1,95 korda 48h ajapunktis) (Joonis 8A). See tulemus kattub eelmise katse tulemusega. Siiski, teiste sihtmärkgeenide ekspressioon nii suures ulatuses ei muutunud. *MET* geeni ekspressioonitase vähenes 1,41 korda (Joonis 8B) ning see tulemus ei ole eelmise katsega kooskõlas, kus ekspressioon tõusis 1,15 korda. *SIRT1* ekspressioon oli vähenenud 1,18 korda (Joonis 8C), mis on kooskõlas eelmise katse tulemusega.

*CDK6* geeni ekspressioonitase vähenes 1,2 korda (Joonis 8D) ning see tulemus on kattuv eelmiste katsetega. *E2F3* ekspressioonitase vähenes 1,3 korda (Joonis 8E).



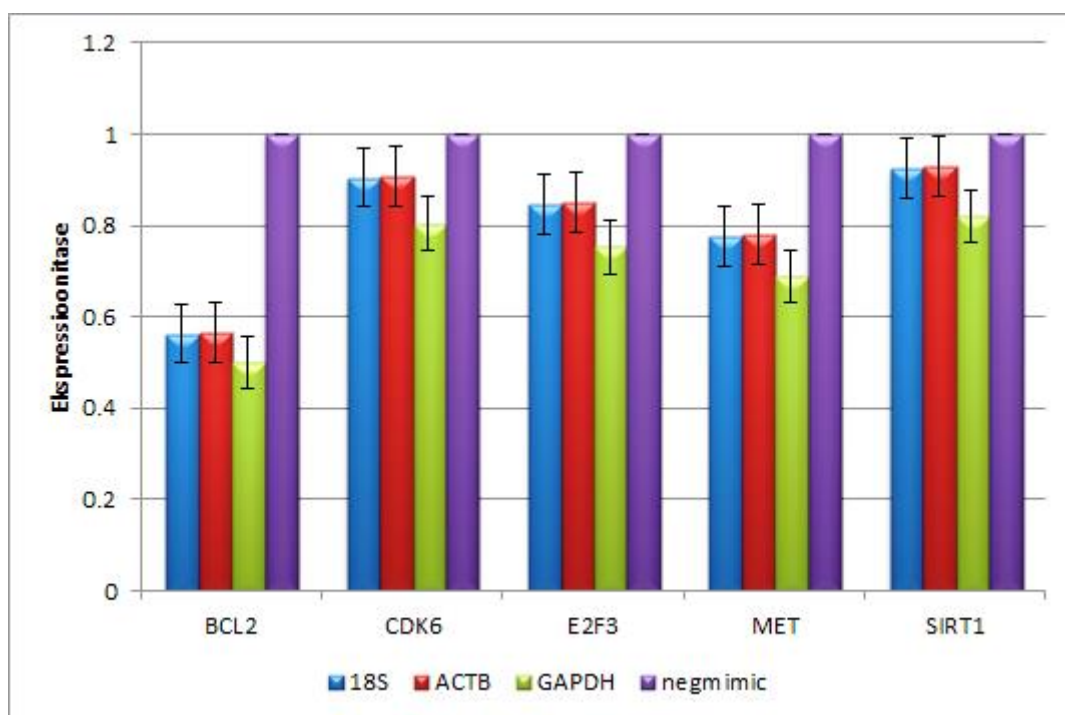
**A****B****C****D****E**

**Joonis 8.** *miR-34a* sihtmärkide ekspressioonitase muutus erinevates ajapunktides. **A.** *Bcl-2*, **B.** *MET*, **C.** *SIRT1*, **D.** *CDK6*, **E.** *E2F3*.

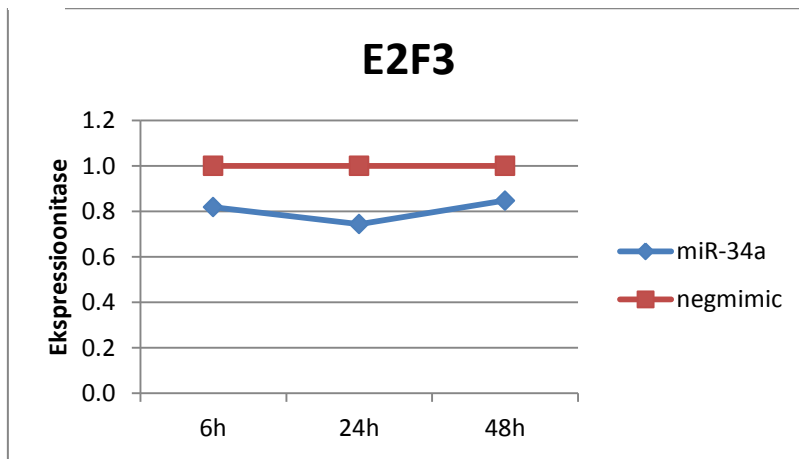
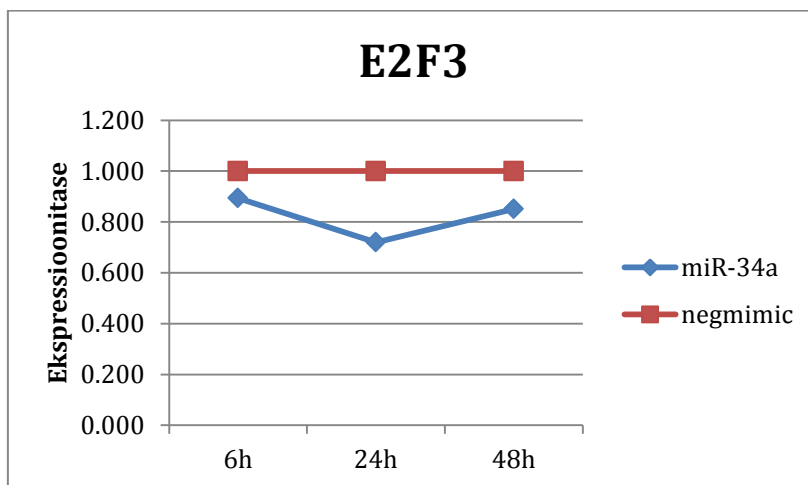
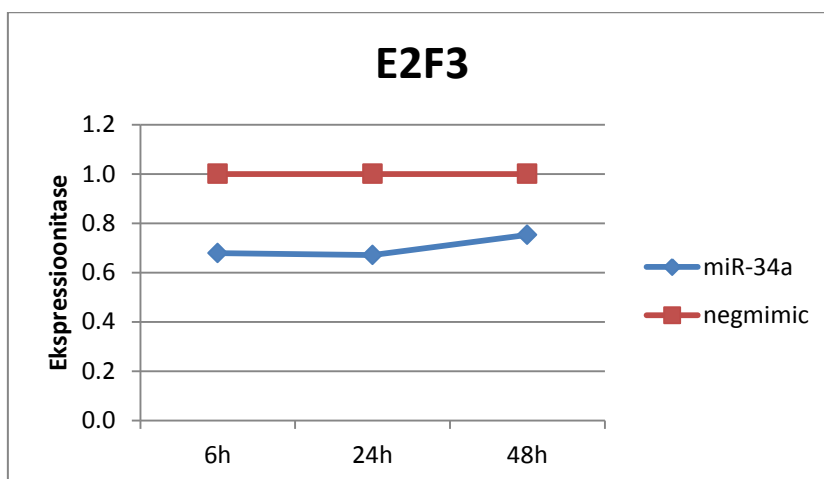
### 3.5. Endogeensete referentskontrollide valiku mõju katsetulemustele.

Kvantitatiivse PCRi puhul võib tulemuste kõikumise üheks põhjuseks olla endogeensete referentskontrollide valik. Antud töös kasutati eesnäärmevähi uurimises enim kasutatavaid endogeenseid kontrolle: *18S*, *ACTB* ja *GAPDH* (Ohl F jt., 2005). Vajda jt oma uurimuses näitasid, et erinevate eesnäärmevähi rakuliinide jaoks on vaja valida ja kontrollida erinevaid endogeenseid referentsgeene. Samuti näitas nende uuring, et endogeensete kontrollide ekspressiooni stabiilsus sõltub ka rakuliini inkubeerimise tingimustest isegi sama vähitüübi korral (Vajda A jt., 2013).

Käesolevas töös uuriti ka sihtmärkgeenide ekspressiooni iga endogeense kontrolli suhtes eraldi (Joonis 9). Lähtudes nendest andmetest võib järeldada, et endogeensete kontrollide vahel esineb teatav varieeruvus, mis mõjutab ka sihtmärkide arvutatud ekspressioonitaset (Joonis 10). Enamasti jääb ekspressiooni suund siiski samaks (Lisa 1).



**Joonis 9.** Sihtmärkgeenide ekspressioonitaseme muutus *miR-34a* miimikuga transfekteeeritud rakkudes erinevate endogeensete referentsgeenide suhtes ajapunktis 48h. Võrdluseks on kasutatud transfektsiooni negatiivse miimikuga (negmimic). Veapiirid tähistavad standardhälvet.

**A****B****C**

**Joonis 10.** *miR-34a* sihtmärgi ekspressiooni muutus *E2F3* näitel erinevates ajapunktides, kasutades erinevaid endogeenseid referentsgeene. **A.** *E2F3* ekspressioonitase *18S* suhtes; **B.** *E2F3* ekspressioonitase *ACTB* suhtes; **C.** *E2F3* ekspressioonitase *GAPDH* suhtes.

### 3.6. Järeldused.

1. Eesnäärmevähi rakuliinis PC-3 on suhteliselt madal *miR-34a* ekspressioonitase ning seetõttu on see rakuliin sobiv mudel *miR-34a* asendusteraapia meetodika testimiseks. *miR-34a* miimiku transfektsioon tõstab *miR-34a* kontsentratsiooni mitu suurusjärku. Samas ei võimalda käesolevas töös kasutatud kommertsiaalne TaqMan süsteem eristada *miR-34a* miimikut protsessitud küpsest *miR-34a*'st.
2. *miR-34a* sihtmärkgeenide ekspressioonitaseme muutus on *miR-34a* transfektsiooni järgselt varieeruv: kõige suurem erinevus ilmnes *Bcl-2* geeni korral.
3. Endogeense referentskontrolli valik mõjutab sihtmärkide arvutatud ekspressioonitaset, kuid enamasti on sihtmärkgeenide ekspressioonitaseme muutus samasuunaline.

### **3.7. Kokkuvõtte**

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida sünteetilise *miR-34a* miimiku toimet sihtmärkgeenide ekspressioonile PC-3 rakuliinis. Kasutades kvantitatiivset reaalaaja PCRi hinnati viie sihtmärkgeeni (*Bcl-2*, *E2F3*, *MET*, *SIRT1*, *CDK6*) ekspressioonitaseme muutusi *miR-34a* miimikuga transfekteeeritud rakkudes. Tulemuste analüüsimise käigus leiti, et kõige suurem muutus oli *Bcl-2* geenil (kuni 2 korda) ning kõige väiksem *SIRT1* geenil.

Samuti leiti, et endogeensete referentskontrollide valik mõjutab sihtmärkide arvutatud ekspressioonitaset. Enamasti on sihtmärkgeenide ekspressioonitaseme muutus siiski samasuunaline

Käesoleva töö tulemused näitavad *miR-34a* miimiku perspektiivi eesnäärmevähi asendusteraapias. Samuti lubavad tulemused väita, et antud sihtmärkgeenide muutusi on võimalik kasutada edasises töös potentsiaalsete terapeutiliste lahenduste väljatöötamisel.

## **Regulatory targets of *miR-34a* in prostate cancer cells.**

**Katerina Shpilka**

### **4. Summary**

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression on post-transcriptional level by degradation of complementary mRNA or translational repression. miRNAs can regulate up to 50% of the protein coding genes and thus are involved in the majority of cellular processes. Downregulation of miRNAs is often a very serious cellular event that contributes to the development of human diseases, including cancer. miRNAs, which are downregulated in cancer, target multiple oncogenic pathways and therefore have a potential of becoming a powerful therapeutic agents. One of such miRNAs is a *miR-34a*.

The main aim of current thesis is to analyze a selected regulatory targets of the *miR-34a* in a prostate cancer cells and to estimate potential usefulness of this system in cancer miRNA replacement therapy.

We have measured changes of expression signals of five target genes in the prostate cancer cell line PC-3 after the transfection with *miR-34a* mimic. Using quantitative real-time PCR, the biggest change in the expression level was observed for *Bcl-2* and the gene with the smallest expression change was *SIRT1*.

The experiments also revealed that endogenous controls influence the results of expression level calculations; however, the direction of the expression level change was not altered.

In conclusion, *miR-34a* mimic has a good perspective in prostate cancer replacement therapy. The study also shows that five regulatory targets can be used in the development of the test system for further possible therapeutic solutions.

## **Tänuavaldused**

Avaldan tänu oma juhendajale, vanemteadur Tarmo Annilole hea juhendamise eest. Lisaks tahan tänu avaldada kõikidele õppetooli inimestele abivalmiduse eest.

Käesolev uurimus on tehtud SA Archimedes poolt finantseeritava projekti "Development of miRNA replacement therapy methods" raames.

## Kasutatud kirjandus

- Bader AG, Brown D, Stoudemire J and Lammers P. (2011). Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Therapy* (2011) 18, 1121–1126; doi:10.1038/gt.2011.79
- Bader AG. (2012). miR-34- a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet.* 2012 Jul 2;3:120. doi: 10.3389/fgene.2012.00120.
- Bagchi A, Mills AA.(2008). The quest for the 1p36 tumor suppressor.Cancer Res. 2008 Apr 15;68(8):2551-6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2095.
- Bartel DP. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR, Fearon ER. (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol.* 2007 Aug 7;17(15):1298-307.
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE. (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumorsuppressor genes. *Curr Biol* 2007;17:1298–1307
- Calin GA and Croce CM.(2006). MicroRNA signatures in human cancers.Nat Rev Cancer 2006;6:857–866
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*99(24),15524–15529 (2002)
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
- Carthew, R. W., Sontheimer, E. J., (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):642-55
- Chen QR, Yu LR, Tsang P, Wei JS, Song YK, Cheuk A, Chung JY, Hewitt SM, Veenstra TD, Khan J. (2011).Systematic proteome analysis identifies transcription factor YY1 as a direct target of *miR-34a*. *J Proteome Res.* 2011 Feb 4;10(2):479-87. doi:



- Cheng CY, Hwang CI, Corney DC, Flesken-Nikitin A, Jiang L, Oner GM, Munroe RJ, Schimenti JC, Hermeking H, Nikitin AY. (2014). miR-34 cooperates with p53 in suppression of prostate cancer by joint regulation of stem cell compartment. *Cell Rep.* 2014 Mar 27;6(6):1000-7. doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.023.
- Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Blelloch R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP. (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.* 2010 May 15;24(10):992-1009. doi: 10.1101/gad.1884710.
- Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH. (2010). p53-independent upregulation of *miR-34a* during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ.* 2010 Feb;17(2):236-45. doi: 10.1038/cdd.2009.109.
- Concepcion CP, Han YC, Mu P, Bonetti C, Yao E, D'Andrea A, Vidigal JA, Maughan WP, Ogrodowski P and Ventura A. (2012). Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002797. doi: 10.1371/journal.pgen.1002797.
- Craig VJ, Tzankov A, Flori M, Schmid CA, Bader AG, Müller A (2012). Systemic microRNA-34a delivery induces apoptosis and abrogates growth of diffuse large B-cell lymphoma in vivo. *Leukemia.* 2012 Nov;26(11):2421-4. doi:10.1038/leu.2012.110.
- De Rosa G, De Stefano D, Galeone A.(2010). Oligonucleotide delivery in cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010 Nov;7(11):1263-78. doi:10.1517/17425247.2010.527942.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):231-5.
- Di Martino MT, Campani V, Misso G, Gallo Cantafio ME, Gulla ` A, et al. (2014) In Vivo Activity of *MiR-34a* Mimics Delivered by Stable Nucleic Acid Lipid Particles (SNALPs) against Multiple Myeloma. *PLoS ONE* 9(2): e90005. doi:10.1371/journal.pone.0090005
- Djuranovic S, Nahvi A, Green R. (2012). MiRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 2012; 336:237-24
- Fei Chen and Shen-Jiang Hu. (2012). Effect of MicroRNA-34a in Cell Cycle, Differentiation, and Apoptosis: A Review. *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY*, Volume 26,

- Filipowicz, W. (2005). RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122, 17-20
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP.(2009). Most 10.mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.*Genome Res* 2009; 19:92-05
- Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M (2008). Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells.*Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 5;377(1):114-9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.086.
- Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. (2008). Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 5;377(1):114-9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.086.
- Gallardo E, Navarro A, Viñolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M (2009). miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2009 Nov;30(11):1903-9. doi: 10.1093/carcin/bgp219.
- Garzon R, Marcucci G, Croce CM.(2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Oct;9(10):775-89. doi: 10.1038/nrd3179. Review
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:167-79. doi: 10.1146/annurev.med.59.053006.104707.
- Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, Weng Z, Zamore PD. (2010). Sorting of Drosophila small silencing RNAs partitions microRNA\* strands into the RNA interference pathway. *RNA.* 2010 Jan;16(1):43-56. doi: 10.1261/rna.1972910.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):235-40.
- Guo Y, Li S, Qu J, Wang S, Dang Y, Fan J, Yu S, Zhang J. (2011). MiR-34a inhibits lymphatic metastasis potential of mouse hepatoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2011 Aug;354(1-2):275-82. doi: 10.1007/s11010-011-0827-0.

- Haifeng Dong, Jianping Lei, Lin Ding, Yongqiang Wen, Huangxian Ju and Xueji Zhang. (2013). MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem. Rev.* 2013, 113, 6207–6233, [dx.doi.org/10.1021/cr300362f](https://doi.org/10.1021/cr300362f)
- He L., He X., Lim L. P., de Stanchina E., Xuan Z., Liang Y., Xue W., Zender Magnus J., Ridzon D., Jackson A. L., Linsley P.S., Chen C., Lowe S. W., Cleary M.A. and Hannon G.J. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007 Jun 28;447(7148):1130-4.
- Hermeking H, (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. Review . *Cell Death and Differentiation* (2010) 17, 193–199; doi:10.1038/cdd.2009.56
- Hermeking H. (2007). p53 Enters the MicroRNA World. Minireview. *Cancer Cell* 12, November 2007. DOI 10.1016/j.ccr.2007.10.028
- Hsu S.D., Chu, C.H., Tsou A.P., Chen S.J., Chen H.C., Hsu P.W., Wong Y.H., Chen Y.H., Chen G.H. and Huang H.D. (2008). miRNAmap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36 (Database issue):D165-9.
- Hwang CI, Matoso A, Corney DC, Flesken-Nikitin A, Körner S, Wang W, Boccaccio C, Thorgeirsson SS, Comoglio PM, Hermeking H, Nikitin AY. (2011). Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 23;108(34):14240-5. doi: 10.1073/pnas.1017536108.
- Javed A, Seyed E. H, Maqsood A. S, Maqsood A, Javed M & Abdulaziz A. Al-K, (2013). MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm. *Indian J Med Res* 137, April 2013, pp 680-694
- Ji Q, Hao X, Meng Y, Zhang M, Desano J, Fan D, Xu L. (2008). Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer*. 2008 Sep 21;8:266. doi: 10.1186/1471-2407-8-266.
- Jidong Liu, Marco Antonio Valencia-Sanchez, Gregory J. Hannon and Roy Parker. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005 July ; 7(7): 719–723
- Kasinski AL and Slack FJ. (2011). MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 11, 849-864 (December 2011) | doi:10.1038/nrc3166

- Kim VN, Han J, Siomi MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 126-39
- Kloosterman WP and Plasterk RH. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006;11: 441–450
- Kozomara A., Griffiths-Jones S., (2013). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2013, Vol. 42, Database issue doi:10.1093/nar/gkt1181
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010 Sep;11(9):597-610. doi: 10.1038/nrg2843.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The *C. Elegans* heterochronic 1. gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75 : 843-54
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003 Sep 25;425(6956):415-9.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., ja Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB.(2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell.* 2003 Dec 26;115(7):787-98
- Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y, Zheng X. (2009). miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2009 Mar 8;275(1):44-53. doi:10.1016/j.canlet.2008.09.035.
- Li Y, Guessous F, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, Johnson E, Marcinkiewicz L, Jiang J, Yang Y, Schmittgen TD, Lopes B, Schiff D, Purow B, Abounader R. (2009). MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res.* 2009 Oct 1;69(19):7569-76. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0529.
- Lin He and Gregory J. Hannon, (2004). MicroRNAs: SMALL RNAs WITH A BIG ROLE IN GENE REGULATION. *Nat. Rev. Genet.* 2004, 5, 522.
- Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, Patrawala L, Yan H, Jeter C, Honorio S, Wiggins JF, Bader AG, Fagin R, Brown D, Tang DG.(2011). The microRNA miR-34a

- inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med*. 2011 Feb;17(2):211-5. doi: 10.1038/nm.2284.
- Liu DW, Chen ST, Liu HP. (2005). Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2005 Dec;26(6):1002-8.
- Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*. 2008 Aug 15;7(16):2591-600.
- López-Dávila V, Seifalian AM, Loizidou M. (2012). Organic nanocarriers for cancer drug delivery. *Curr Opin Pharmacol*. 2012 Aug;12(4):414-9. doi: 10.1016/j.coph.2012.02.011.
- Marilena V. Iorio, Carlo M. Croce. (2011). MicroRNA dysregulation in cancer:diagnostics, monitoring and therapeutics.A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 4, 143–159, DOI 10.1002/emmm.201100209
- May P, May E.(1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7621-36.
- McGarty T. (2014). Prostate cancer: miR-34a, p53, MET and methylation. White Paper No 112, May, 2014
- Nanni S, Aiello A, Re A, Guffanti A, Benvenuti V, Colussi C, Castro-Vega LJ, Felsani A, Londono-Vallejo A, Capogrossi MC, Bacchetti S, Gaetano C, Pontecorvi A, Farsetti A. (2013). Estrogen-dependent dynamic profile of eNOS-DNA associations in prostate cancer. *PLoS One*. 2013 May 3;8(5):e62522. doi: 10.1371/journal.pone.0062522.
- Nobuhiro Okada, Chao-Po Lin, Marcelo C. Ribeiro, Anne Biton, Gregory Lai, Xingyue He, Pengcheng Bu, Hannes Vogel, David M. Jablons, Andreas C. Keller, J. Erby Wilkinson, Biao He, Terry P. Speed, and Lin He1. (2014). A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev*. 2014 28: 438-450. doi: 10.1101/gad.233585.113
- Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonić A, Jung K. (2005). Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?. *J Mol Med (Berl)*. 2005 Dec;83(12):1014-24.
- Okamura K, Liu N, Lai EC.(2009). Distinct mechanisms for microRNA strand selection by

- Drosophila Argonautes*. *Mol Cell*. 2009 Nov 13;36(3):431-44. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.027.
- Pasquinelli AE. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13;13(4):271-82. doi: 10.1038/nrg3162.
- Pérez S, Royo L, Astudillo A, Escudero D, Álvarez F, Rodríguez A, Gómez E, Otero J. (2007). Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC Molecular Biology* 2007, 8:114, doi:10.1186/1471-2199-8-114
- Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, Maitra A. (2011). Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther*. 2011 Aug;10(8):1470-80. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0152.
- Qing Ji, Xinbao Hao, Min Zhang, Wenhua Tang, Meng Yang, Ling Li, Debing Xiang, Jeffrey T Desano, Guido T Bommer, Daiming Fan, Eric R Fearon, Theodore S Lawrence, Liang Xu. (2009). MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 2009 28;4(8):e6816.
- Qiu X, Friedman JM, Liang G.(2011). Creating a flexible multiple microRNA expression vector by linking precursor microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 29;411(2):276-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.123.
- Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z, Oren M. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2007 Jun 8;26(5):731-43.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-6
- Rui Yi, Yi Qin, Ian G. Macara and Bryan R. Cullen. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. Dec 15, 2003; 17(24): 3011–3016. doi: 10.1101/gad.1158803
- Sam Griffiths-Jones, Harpreet Kaur Saini, Stijn van Dongen and Anton J. Enright. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 2008, Vol. 36, D154–D158, doi:10.1093/nar/gkm952

- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. ja Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208
- Shen Z, Zhan G, Ye D, Ren Y, Cheng L, Wu Z, Guo J (2012). MicroRNA-34a affects the occurrence of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the antiapoptotic gene survivin. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(4):2473-80. doi: 10.1007/s12032-011-0156-x.
- Sotillo E, Laver T, Mellert H, Schelter JM, Cleary MA, McMahon S, Thomas-Tikhonenko A. (2011). Myc overexpression brings out unexpected antiapoptotic effects of miR-34a. *Oncogene*. 2011 Jun 2;30(22):2587-94. doi: 10.1038/onc.2010.634.
- Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X. (2008). Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett*. 2008 Apr 30;582(10):1564-8. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.057.
- Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Bühler A, Kienle D, Winkler D, Dürig J, van Oers MH, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. (2009). miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3801-8. doi: 10.1182/blood-2008-08-172254.
- Zhao T, Li J, Chen AF. (2010). MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Jul;299(1):E110-6. doi:10.1152/ajpendo.00192.2010.
- Zilfou JT, Lowe SW. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Nov;1(5):a001883. doi: 10.1101/cshperspect.a001883.
- Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ.(2011). Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther*. 2011 Jun;19(6):1116-22. doi: 10.1038/mt.2011.48.
- Vajda A, Marignol L, Barrett C, Madden SF, Lynch TH, Hollywood D, Perry AS. (2013). Gene expression analysis in prostate cancer: the importance of the endogenous control. *Prostate*. 2013 Mar;73(4):382-90. doi: 10.1002/pros.22578.
- Welch C, Chen Y, Stallings RL.(2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2007 Jul 26;26(34):5017-22
- Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, Bader AG. (2010).

Development of a Lung Cancer Therapeutic Based on the Tumor Suppressor MicroRNA-34. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):5923-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0655.

Vogt M, Munding J, Grüner M, Liffers ST, Verdoodt B, Hauk J, Steinstraesser L, Tannapfel A, Hermeking H (2011). Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch.* 2011 Mar;458(3):313-22. doi: 10.1007/s00428-010-1030-5.

Yamakuchi M. (2012). MicroRNA Regulation of SIRT1. *Front Physiol.* 2012 Mar 30;3:68. doi: 10.3389/fphys.2012.00068.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K and Yi M et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9: 189–198



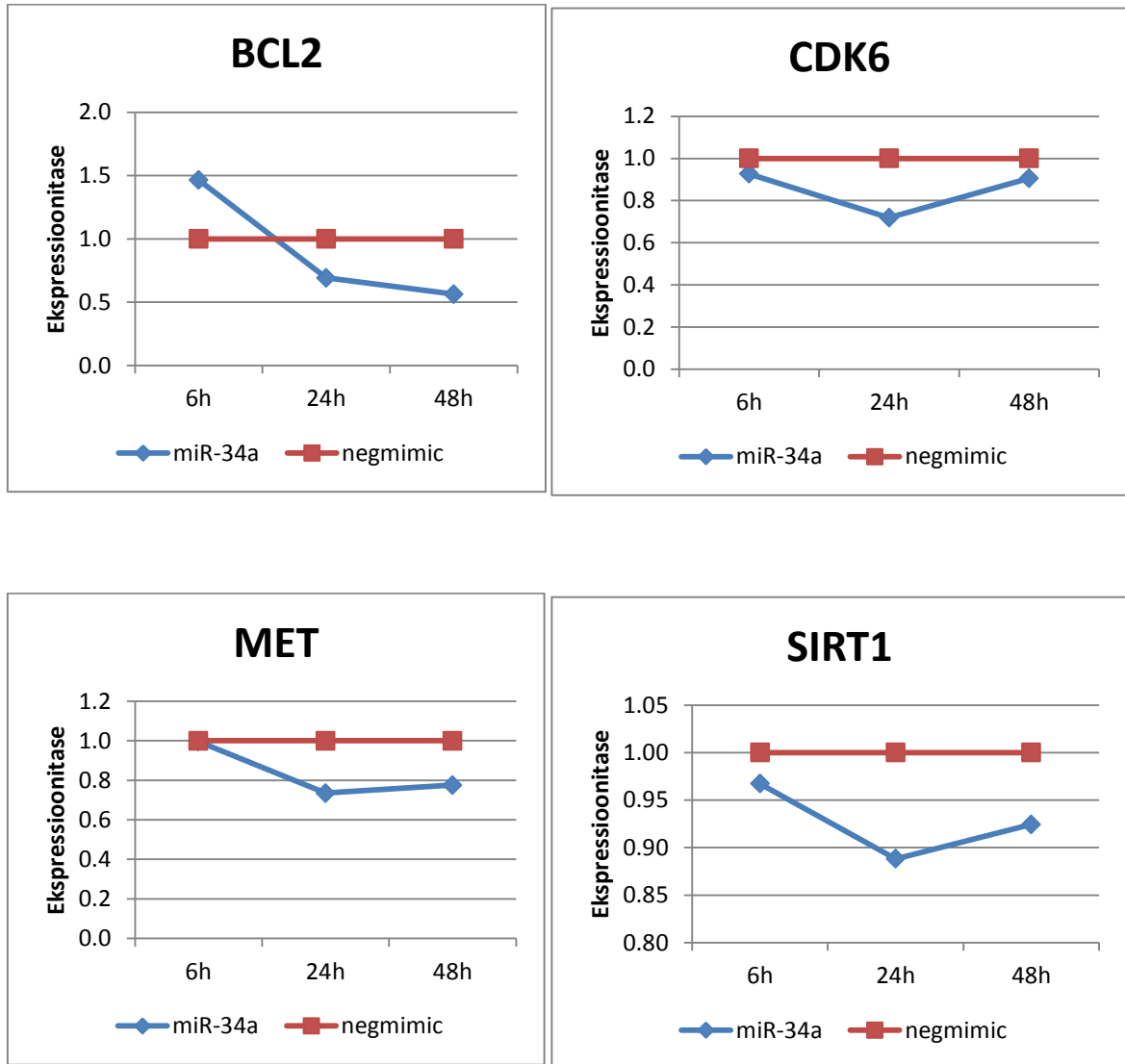
## **Kasutatud veebiaadressid**

1. <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/> (17.03.2014)
2. <http://miRNAmap.mbc.nctu.edu.tw/> (6.03.2014)
3. <http://www.mirnarx.com/Pipeline/Pipeline.aspx> (10.04.2014)
4. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01829971> (10.04.2014)
5. <http://www.mirnarx.com/> (10.04.2014)
6. <http://rnaitherapeutics.blogspot.com/2013/04/mirna-therapeutics-brings-first.html> (11.04.2014)
7. [http://www.mirnarx.com/pdfs/Mirna\\_AACR\\_release\\_20140408\\_FINAL.pdf](http://www.mirnarx.com/pdfs/Mirna_AACR_release_20140408_FINAL.pdf) (11.04.2014)
8. <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/mirnatargetpub.html> (12.04.2013)
9. <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index> (12.04.2013)
10. <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> (12.04.2013)
11. <http://starbase.sysu.edu.cn/> (12.04.2013)

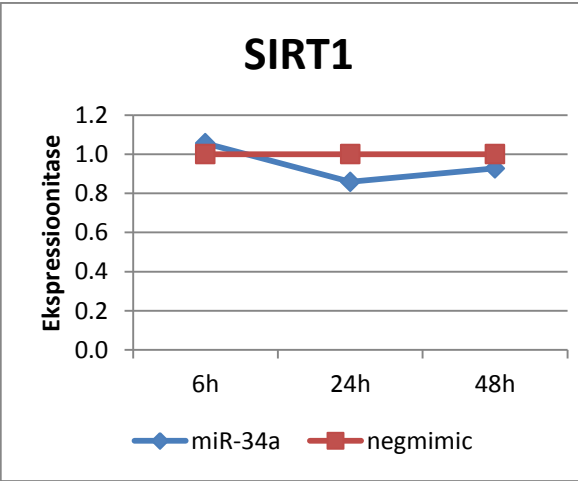
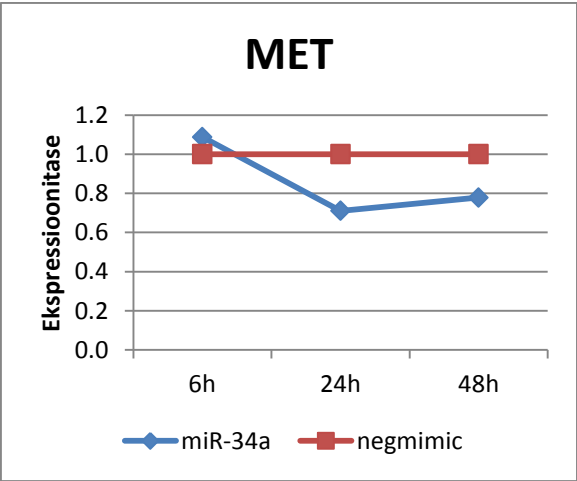
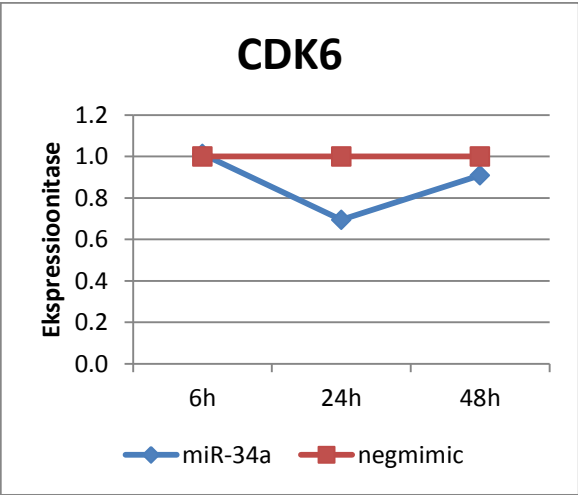
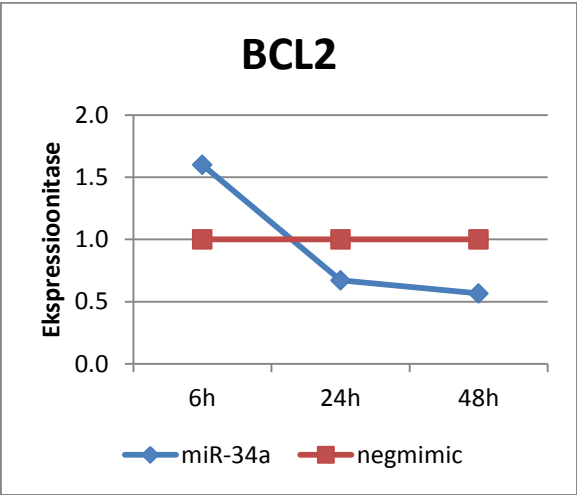
Lisad.

*Lisa 1. miR-34a sihtmärkide ekspressiooni muutus transfektsiooni jooksul, kasutades erinevaid endogeenseid kontrolle.*

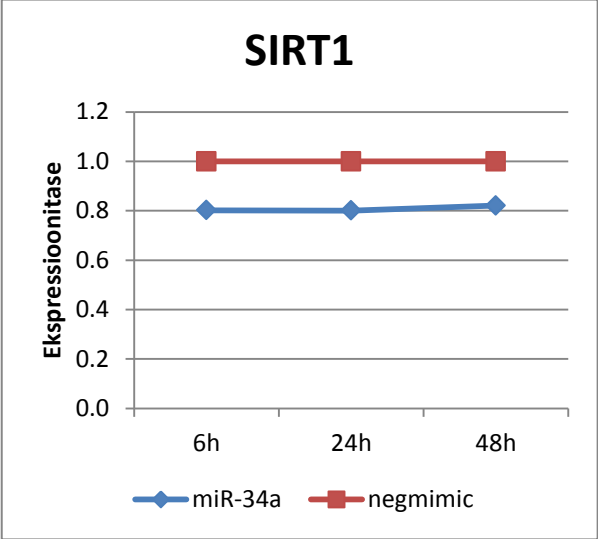
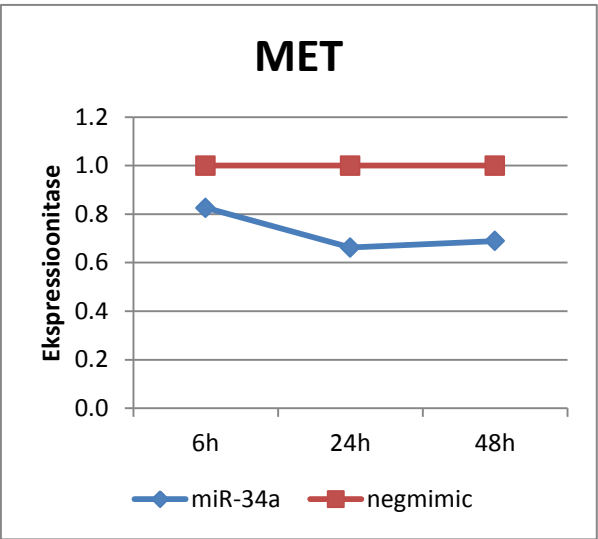
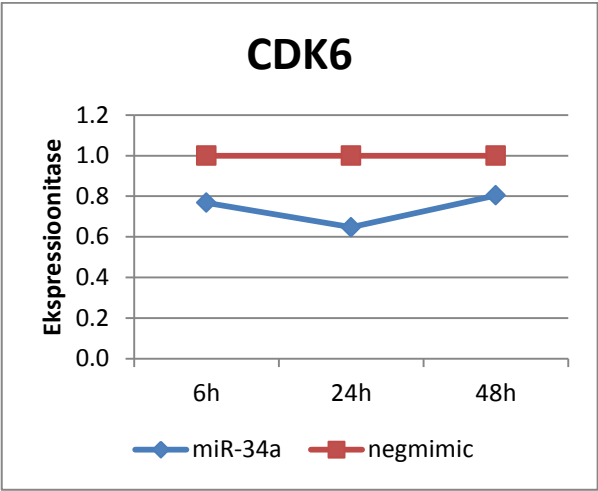
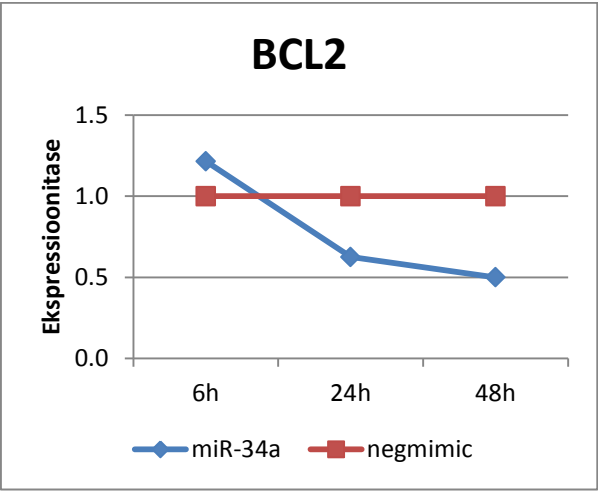
18S



**ACTB**



**GAPDH**



## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Katerina Špilka

(sünnikuupäev: 18.07.1989.)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„*miR-34a* reguletoorsed sihtmärgid eesnäärmevähi rakkudes“

mille juhendaja on Tarmo Annilo, PhD

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **kk.pp.aaaa** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014.